Untersuchung zur Speicherung und Funktion von Sulfatid in Neuronen anhand von transgenen Mäusen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von
Rebekka Maria van Zyl
aus Köln

Köln, 2009

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schwarz
Prof. Dr. V. Gieselmann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2009

1 Einleitung

1.1 Das Nervensystem der Vertebrata

Das Nervensystem von Vertebraten ist ein Netzwerk von spezialisierten Zellen. Es wird im Allgemeinen in zwei Bereiche eingeteilt: das zentrale Nervensystem (ZNS), das beim Menschen und den übrigen Wirbeltieren das Gehirn und das Rückenmark umfasst, und das periphere Nervensystem, das den Teil des Nervensystems umfasst, der außerhalb des Gehirns und Rückenmarks gelegen ist.

Das Nervensystem besteht hauptsächlich aus Nervenzellen (Neuronen), die bei Nagetieren ca. 35 % der Zellen, beim Menschen etwa 10 % ausmachen (Baumann & Pham-Dinh, 2001), sowie den verschiedenen Neurogliazellen. Gliazellen bilden im Vergleich zu Neuronen die Mehrheit der ZNS-spezifischen Zelltypen. Sie sind die Stützzellen, die für die strukturelle Verstärkung des Nervensystems verantwortlich sind. Sie schützen die Neuronen durch eine Isolierungsschicht und unterstützen sie auch in verschiedenen anderen Funktionen. Im Gehirn und im Rückenmark des ZNS wird zwischen Mikrogliazellen und Makrogliazellen unterschieden, wobei letztere sowohl aus Astrozyten als auch aus Oligodendrozyten bestehen. Die Mikrogliazellen machen etwa 5-20 % aller Gliazellen im ZNS aus und kommen sowohl in der weißen wie auch in der grauen Substanz vor. Sie sind die zerebralen Makrophagen. Verschiedenartige pathologische Veränderungen, z.B. durch Verletzungen oder den Befall von Fremdorganismen im ZNS führen zu ihrer Aktivierung, die sie befähigt, eine adaptive Immunreaktion zu initiieren (Drenkhahn & Zenker, 1994; Kreutzberg, 1996). Daraufhin verändert sich ihre Morphologie zu amöboiden Zellen, die Phagozytose betreiben (Bechmann & Nitsch, 1997). Neben der Beseitigung von Pathogenen entfernen die zerebralen Makrophagen ebenfalls zytotoxische Substanzen und abgestorbene Zellbestandteile (Streit, 2001; Raivich & Banati, 2004).

Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen im ZNS. Sie kommen sowohl in der weißen Substanz als fibrillenreiche Faserglia vor, als auch in der grauen Substanz als protoplasmatische Astrozyten. Sie umschließen die Blutkapillaren im Gehirn und sind ein wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Über chemische Signale kommunizieren sie sowohl untereinander als auch mit Neuronen.

Die Oligodendrozyten kommen nur im ZNS vor und interagieren untereinander und mit Neuronen. Sie besitzen kleine runde Zellkerne, die sehr heterochromatinreich sind. Mit ihren strahlenförmigen Fortsätzen bilden sie die elektrisch-isolierende Myelinschicht um die Axone. Im peripheren Nervensystem wird die Myelinschicht von den Schwannschen Zellen gebildet.

Axone werden im Verlauf der Entwicklung des Nervensystems myelinisiert, indem die Membranen der Schwannschen Zellen oder der Oligodendrozyten in bis zu 50 verschiedenen konzentrischen Lagen um die Axone der Neuronen wachsen. Durch die Verdrängung des Zytoplasmas aus diesen Membranschichten kommt es zu einer kompakten Lipidschicht, dem Myelin. Myelin erhält dadurch eine spiralförmige Struktur mit einem besonders hohen Lipid-Gehalt von 70 % (Baumann & Pham-Dihn, 2001). Myelin ist reich an Cholesterol, Phospholipiden und Glykosphingolipiden, wobei Galaktosylceramid und Sulfatid den größten Anteil ausmachen (Morell et al., 1994). Da diese Lipide eine schlechte elektrische Leitfähigkeit besitzen, sorgt die Myelinschicht für die elektrische Isolierung der Axone. Diese sog. Myelinscheide wird in ihrer Kontinuität um die Axone in bestimmten Abständen unterbrochen. Diese Unterbrechungen werden Ranviersche Schnürringe genannt. Der zwischen je zwei Ringen gelegene myelinisierte Abschnitt wird als Internodium bezeichnet. Die Reizweiterleitung entlang der Axone erfolgt durch Aktionspotentiale von Schnürring zu Schnürring, was den Vorteil einer schnelleren saltatorischen Erregungsweiterleitung gegenüber den nicht-myelinisierten Axonenbahnen wirbelloser Tiere hat.

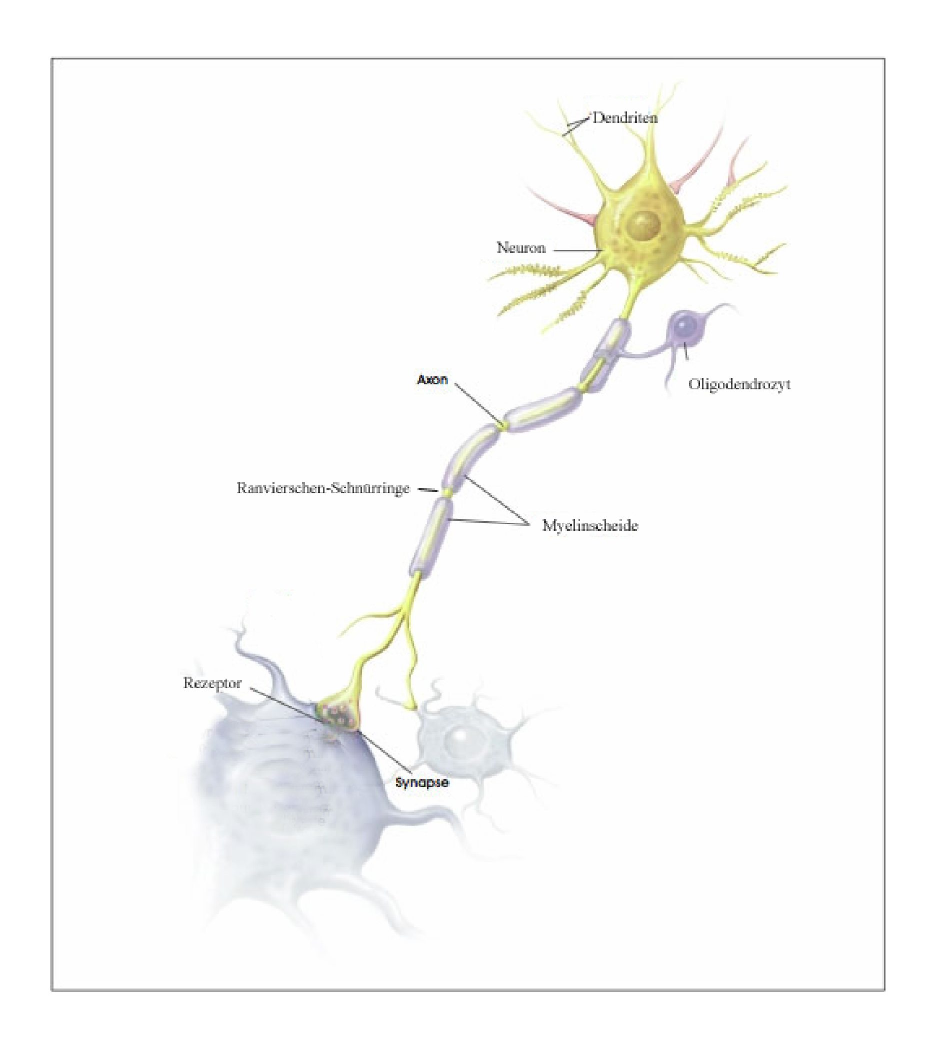


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Neurons. Oligodendrozyten bilden eine isolierende Myelinschicht um die Axone der Neuronen. Die Unterbrechungen der Myelinscheide werden Ranviersche Schnürringe genannt (modifiziert nach stem cells - stemcells.nih.gov-).

Untersuchungen an Mäusen, bei denen die Lipidsynthese der Myelinlipide defekt ist, zeigen deren Wichtigkeit für die Formation und Erhaltung von Myelin (Bosio et al., 1996; Coetzee et al., 1996). Ein bekanntes Mausmodell, das dies verdeutlicht ist die Cerebrosid-Galaktosyltransferase (CGT)-Knockout-Maus (Coetzee et al., 1996; Bosio et al., 1998; Dupree et al., 1998), die weder Galaktosylceramid (GalCer) noch Sulfatid bilden kann. Die Tiere zeigen hauptsächlich eine fortschreitende Demyelinisierung und sterben bereits nach drei bis zwölf Wochen (Bosio et al., 1996; Coetzee et al., 1996; Dupree et al., 1998).

1.2 Lipide: Struktur und Funktion der Sphingolipide

Lipide stellen eine Klasse von Molekülen dar, deren strukturelle und biologische Funktionen sehr vielseitig sind. Lipide sind in Wasser unlöslich, aber in Fetten und organischen Solventien (Chloroform) löslich. Die Hauptaufgabe von Lipiden in einem zellulären Verband ist die Formation der Permeabilitätsbarriere von Zellen und subzellulären Organellen in der Form einer Lipid-Doppelschicht (Singer & Nicolson, 1972). Es gibt drei Hauptgruppen von Membranlipiden: Cholesterin, Glycerolipide und Sphingolipide.

Cholesterin leitet sich von den Stearoiden ab, Glycerolipide vom Glycerin und Sphingolipide vom Sphingosin (Kolter & Sandhoff, 1999). Unter den Sphingolipiden nimmt Sphingomyelin eine Sonderstellung ein, da es aufgrund seiner polaren Phosphatgruppe auch zu den Phospholipiden zählt.

Sphingolipide sind mittels ihres lipophilen Anteils, dem Ceramid, in der Membran verankert und bilden zusammen mit den Glykoproteinen und Glykoaminoglykanen die sogenannte Glykocalix (mit Ausnahme von Sphingomyelin).

Sphingolipide liegen in unterschiedlichen Formen vor, die art- und zelltypspezifisch sind (van Meer & Lisman, 2002). Dabei können sie mit vielen Zuckerresten verknüpft sein, die in ihrer Art und Anzahl variieren (sog. Glykosphingolipide, Kolter & Sandhoff, 1999). Der Lipidanker der Glykosphingolipide kann ebenfalls in der Alkylkettenlänge, im Sättigungs- und Hydroxylierungsgrad variieren. Zusammen mit den Phospholipiden stellen die Glykosphingolipide die Hauptbausteine der eukaryotischen Plasmamembran dar.

Eine der übergeordneten Hauptfunktionen von Glykosphingolipiden ist die Beteiligung an der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Hucho, 1982) sowie der Aufbau der Permeabilitätsbarriere der Haut (Wertz & van den Bergh, 1989). Glykosphingolipide sind an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt und treten in Wechselwirkung mit Rezeptoren und Enzymen innerhalb der Membranen (Yamashita et al., 2002). Des Weiteren sind sie an Signaltransduktion (Huwiler et al., 2000), Apoptose, Proliferation, Differenzierung und Entzündungsprozessen beteiligt (Maceyka et al., 2005; Posse de Chaves, 2006; Taha et al., 2006). Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Myelinscheiden des peripheren und zentralen Nervensystems. Zudem dienen Glykosphingolipide als Bindungsstellen für Viren (Markwell et al., 1981), Bakterien (Karlsson, 1981) und Toxine (Walton et al., 1988). Kommt es bei der Synthese oder dem Abbau von Sphingolipiden zu Defekten, so können verschiedene degenerative neuronale Erkrankungen hervorgerufen werden (s. Abschnitt 1.5).

Die Ausgangssubstanz von Sphingomyelinen (Phosphosphingolipide) und Glykosphingolipiden ist Ceramid. Ceramid besteht aus einer Fettsäure und aus einem langkettigen Aminoalkohol, dem D-erythro-Sphingosin. Die Synthese beginnt im Endoplasmatischen Retikulum und wird im Golgi-Apparat fortgesetzt. Zuerst vermittelt die Serin-Palmitoyltransferase eine Kondensation von Palmitoyl-CoA und L-Serin zu 3-Ketosphinganin. Danach erfolgt eine NADPH-abhängige Reduktion von 3-Ketosphinganin zu D-*erythro*-Sphinganin. In der nächsten Reaktion wird Sphinganin zu Dihydroceramid, welches weiter zu Ceramid dehydriert wird (Rother et al., 1992; Michel et al., 1997; Geeraert et al., 1997).

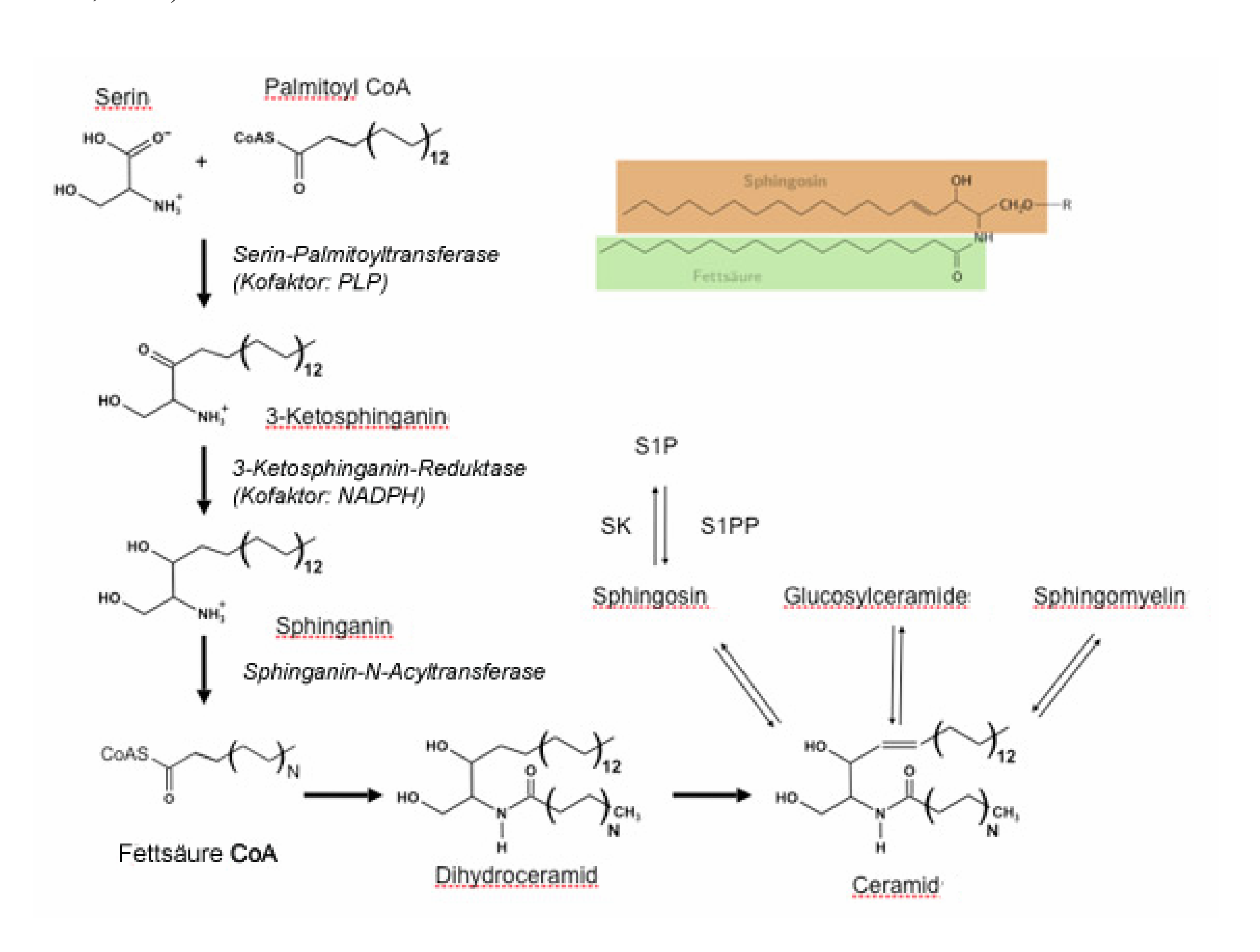


Abb. 1.2 : Ceramidsynthese. Aus Serin und Palmitoyl-CoA wird Ceramid über 3-Ketosphinganin, Sphinganin und Dihydroceramid gebildet. Das Ceramid bildet das Grundgerüst für weitere komplexere Sphingolipide (Abb. modifiziert nach Stoffel & Bosio, 1997). (CoA = Coenzym A, PLP = Pyridoxalphosphat, NADPH = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form); SK= Sphingosin-Kinase, S1P= Sphingosin-1-Phopshat; S1PP= Sphingosin-1-Phopshat-Phosphatase).

Erfolgt eine Übertragung der Phosphorylcholin-Gruppe des Phosphatidylcholins auf das Ceramid, so entstehen Sphingomyelin (Abb. 1.4) sowie Diacylglycerin. Sphingomyelin ist ein Bestandteil von Myelinscheiden und Plasmamembranen.

Abb. 1.3: Sphingomyelin. Das Grundgerüst bildet das Sphingosin. An die C_2-Aminogruppe ist eine Fettsäure über eine Amidbindung verknüpft und an die C_1-Hydroxylgruppe eine Phosphatgruppe über eine Phosphoesterbindung.

Durch die ß-glykosidische Addition von Zuckerresten an das Ceramid entsteht durch das Anhängen von Galaktose, Galaktosylceramid (GalCer) oder von Glukose, Glucosylceramid (GlcCer) (Schulte & Stoffel, 1993; Paul et al., 1996). Die Biosynthese von Ceramid und Galaktosylceramid läuft im Endoplasmatischen Retikulum ab. Die Zugabe von Glukoseresten zur Bildung von Glucosylceramid oder von Phosphocholin auf Ceramid zur Bildung von Sphingomyelin erfolgt im Golgi-Apparat. Einige Glykosphingolipide, wie die Ganglioside leiten sich vom Laktosylceramid ab, das durch die Übertragung eines Glukoserestes und anschließend eines Galaktoserestes auf die primäre Hydroxylgruppe von Ceramid entsteht (Basu et al., 1968). Die Biosynthese der Ganglioside erfolgt im Golgi-Apparat.
Ganglioside, die zur Klasse der Glykolipide gehören, sind besonders häufig auf der Oberfläche von Neuronen vorhanden. Sie entstehen aus den Vorläufer-Gangliosiden GM3 und GD3 wobei verschiedene Sialyltransferasen die Anbindung der Sialinsäuren katalysieren (Pohlentz et al., 1988; Kolter et al., 2002; van Echten-Deckert & Herget, 2006).

1.3 Cerebosid-Sulfotransferase (CST)

Die Cerebrosid-Sulfotransferase ist ein Typ II-Transmembranprotein. Sie transferiert mit Hilfe des Sulfatdonors PAPS (3´-Phosphoadenosin-5´-Phosphosulfat) eine Sulfatgruppe auf die 3´-Hydroxyl-Gruppe von Galaktosylceramid (Morell & Radin, 1969; Basu et al., 1971; van der Bijl et al., 1996). Lactosylceramid (LacCer) wird von den Enzymen UDP-Glukose-Ceramid Glycosyltransferase (GlcT-1) und UDP-Galaktose-Glukosyl-CGT synthetisiert. Im nächsten Schritt wird LacCer mittels der CST sulfatiert. Die Synthese von Sulfatid und Sulfolaktosylceramid (SLacCer) erfolgt im Golgi-Apparat (Eckhardt et al., 2007; Molander-Melin et al., 2004).

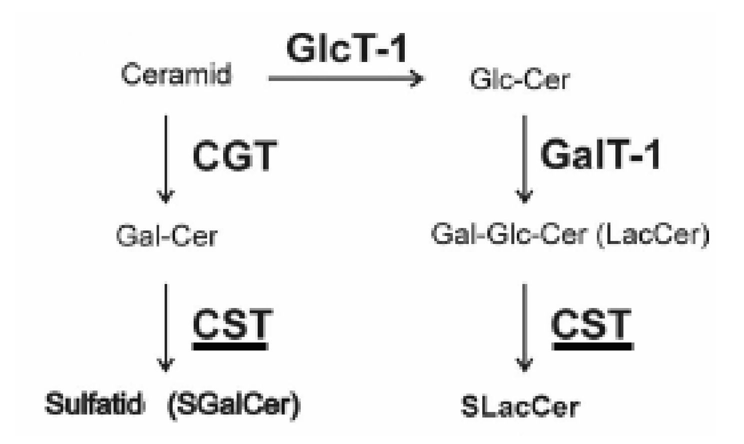


Abb. 1.4: CST katalysiert die Synthese von Sulfatid und SLacCer. (modifiziert nach Eckhardt et al., 2007). CGT = Cerebrosid-Galaktosyltransferase; Gal-Cer = Galaktosyl-Ceramid; GlcT-1 = Glukose-Ceramid-Glykosyltransferase; GalT-1 = Galaktose-Glukosyl-CGT; LacCer = Laktosyl-Ceramid; SLacCer = Sulfo-Laktosyl-Ceramid

Ein Hauptprodukt ausgehend vom Ceramid ist das Glykosphingolipid 3-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid, s. 1.4), was hauptsächlich in Gehirn und Nieren gebildet wird (Honke et al., 2004; Ogawa et al., 2004).
Die CST cDNA wurde bisher aus Maus und Mensch kloniert. Beide CSTs weisen zwei N-Glykosylierungsstellen an Asn-66 und Asn-312 auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung von Asn-66 und Asn-312 für die vollständige katalytische Aktivität muriner-CST erforderlich ist (Eckhardt et al., 2002).
Die Golgi-Lokalisation einiger Sulfo- und Glykosyltransferasen geht einher mit der Fähigkeit zur Oligomerisierung (Colley 1997). Im Falle der CST ist die Lokalisation auf den medial-trans-Golgi beschränkt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die CST Homodimere in lebenden Zellen bildet (Yaghootfam et al., 2007) und dass die Dimerisierung durch die luminale Domäne des Enzym vermittelt wird. Diese Oligomerisierung der CST ist unabhängig von den N-Glykosylierungsstellen und der Transmembran-Domäne.

1.4 Synthese und Abbau von Sulfatid

Sulfatid (3-O-Sulfogalaktosylceramid) ist zusammen mit Sphingomyelin eines der ersten Sphingolipide, das von Thudichum 1884 beschrieben wurde. Sulfatid macht ungefähr drei bis vier Prozent des totalen Lipidgehaltes des Myelins aus (Norton & Poduslo, 1982). Wie viele andere Sphingolipide weist die Struktur des Sulfatids Acylketten verschiedener Längen auf. Die Acylreste können auch hydroxyliert sein. Sulfatid ist ein Sulfatester von Galaktosylceramid, in dem die Sulfatgruppe an die C-3 Hydroxyl-Gruppe gebunden ist (Stoffyn & Stoffyn, 1963; von Figura et al., 2001). Das Grundgerüst Sphingosin besteht hauptsächlich aus C-18 Sphingoidbase (Stoffyn, 1966). Die Haupt-Fettsäurekettenlänge von Sulfatid unterscheidet sich zwischen weißer und grauer Substanz. Sulfatid besteht in adulter humaner weißer Substanz hauptsächlich aus C22-C26 Fettsäuren, wobei im infantilen Gehirn C18-Fettsäureketten einen signifikanten Anteil ausmachen (Pernber et al., 2007)

Abb. 1.5: 3-O-Sulfogalaktosylceramid (Kolter & Sandhoff, 1999). Das Grundgerüst ist ein Galaktocerebrosid an dem eine Sulfatgruppe angelagert ist.

Die Synthese von Sulfatid startet im Endoplasmatischen Reticulum. Die UDP-Galaktose:Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT), ein ca. 54 kDa großes Enzym, das C-terminal eine Transmembrandomäne sowie ein ER-Rückhaltesignal besitzt (Sprong et al., 1998), katalysiert den Transfer von Galaktose auf die C_1-Hydroxylgruppe des Ceramids, wobei Galaktosylceramid gebildet wird (Bosio et al., 1996a; Stoffel & Bosio, 1997). Dabei kann sowohl nicht-hydroxyliertes-Ceramid als auch 2-hydroxyliertes Ceramid als Substrat dienen (Morell & Radin, 1969; Basu et al., 1971; van der Bijl et al., 1996).

Das entstandene Galaktosylceramid (GalCer) wird zum Golgi-Apparat transportiert, wo es schließlich zu Sulfatid verestert wird.

Der Abbau von Sulfatid erfolgt in lysosomalen Kompartimenten. Dabei katalysiert die Arylsulfatase A (ASA) im ersten Schritt eine Hydrolyse der Sulfatgruppe. Diese Reaktion benötigt als Co-Faktor Sphingolipid Aktivator Protein B (Saposin B), welches das Sulfatid

aus der Membran herauslöst und somit der ASA zugänglich macht (Kolter & Sandhoff, 2005; Eckhardt, 2008).
GalCer wird mit Hilfe des Enzyms Galaktocerebrosid ß-Galaktosidase in die Bestandteile Ceramid und Galaktose zerlegt (Abb. 1.6)

Abb. 1.6: Abbau von Sulfatid. Der Abbau erfolgt in Lysosomen, katalysiert von dem Enzym ASA und dem Aktivatorprotein Saposin B (GalCer = Galaktosylceramid; ASA = Arylsulfatase A; SapA/B = Saposin A/B).

Aufgrund eines Defektes im ASA-Gen oder, in selteneren Fällen des Saposin B-Gens kommt es zur Akkumulation von Sulfatid in Lysosomen (Gieselmann et al., 1998; Eckhardt, 2008). Die daraus entstehende Krankheit wird metachromatische Leukodystrophie genannt (s. Abschnitt 1.6).

1.4.1 Funktion von Sulfatid im zentralen Nervensystem

Sulfatid ist ein Hauptbestandteil von myelinisierenden Zellen im zentralen Nervensystem. Über starke ionische Interaktion ist Sulfatid an das Myelin Basische Protein (MBP) und an Proteolipid Protein (PLP) gebunden. Zusammen mit Galaktosylceramid (GalCer) hat Sulfatid eine unterstützende Isolierungs-Funktion der Membranschicht und trägt damit zur Erhöhung der Nervenleitgeschwindigkeit bei. (Arvanitis et al., 1992; Norton & Poduslo, 1973; Vacher et al., 1989; Schmidt & Thews, 2000).
Es wird vermutet, dass Sulfatid auch beim aktiven Natrium-Transport als Co-Faktor der Natrium-Kalium-ATPase dient (Rintoul & Welti, 1989).
Sulfatid ist hauptsächlich in Oligodendrozyten und in Schwann-Zellen vorhanden, aber auch in Neuronen und Astrozyten. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob Neuronen und Astrozyten selbst Sulfatid synthetisieren oder ob es durch Lipoprotein-Endozytose importiert wird. Eine

Möglichkeit ist, dass Sulfatid mit Hilfe von Rezeptor-vermittelter Endozytose in Neurone transportiert wird (Han, 2007).

ApoE enthaltende Lipoproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Lipid-Homöostase im Gehirn (Han, 2004). Sulfatid ist in den ApoE-enthaltenden HDL (*High Density Lipoprotein*)-like Lipoproteinen der cerebrospinalen Flüssigkeit von Menschen enthalten. Aufgrund der Expression von ApoE-Rezeptoren auf Neuronen ist es diesen möglich, über Endozytose ApoE-Lipoproteine aufzunehmen (Pitas et al., 1987; Han, 2004). Dies ist vor allem wichtig, um Cholesterol für das Axonwachstum und die Reparatur zu transportieren (Vance et al., 2006). Das von Han (Han et al., 2003; 2007) vorgeschlagene Modell beschreibt, dass die von den Astrozyten ausgeschütteten ApoE-Lipoproteine Sulfatid von der Myelin-Membran aufnehmen und über Endozytose mit Hilfe des LDL-Rezeptors oder LDL-Rezeptor-ähnlichen Proteinen in Neuronen transportieren.

Sulfatid spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Oligodendrozyten als negativer Regulator. Wie Untersuchungen an CST-Knockout-Mäusen zeigten, führt ein Sulfatid-Defizit zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg an differenzierten Oligodendrozyten (Hirahara et al., 2004). Auch scheint Sulfatid an der Initiation der Myelinisierung beteiligt zu sein. Im Fall von Schwann-Zellen bindet Sulfatid an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin oder Tenascin-R (Roberts et al., 1985; Pesheva et al., 1997). Diese interagieren wiederum mit Signalmolekülen der Gliamembran, wie beispielsweise Integrinen und F3. Somit wird ein Signalweg aktiviert, der über die c-src/fyn Kinase vermittelt wird (Li et al., 2005).

Sulfatid hat einen Einfluss auf glial-axonale Signalweiterleitung, denn in CST-Knockout-Mäusen wurde ein verringerter Axondurchmesser gemessen (Marcus et al., 2006). Auch konnte eine Dislokation von Ionenkanälen beobachtet werden, die mit der Zerstörung der glial-axonalen Verbindungen an den Paranodien zusammenhängen könnte (Ishibashi et al., 2002). Dass Sulfatid wichtig für die Erhaltung des axo-glialen Kontaktes im peripheren Nervensytem ist, zeigte sich ebenfalls bei den CST-Knockout-Mäusen. Bei ihnen treten in den peripheren Nerven ausgedehnte axonale Veränderungen an den Ranvierschen Schnürringen auf, mit abnormal großen Vesikeln. Die verschiedenen Adhäsionsmoleküle, wie Caspr (Contactin assoziiertes Protein) und Neurofascin 155 (NF 155, Gliales Adhäsionsprotein) befinden sich in nur noch zur Hälfte in der paranodalen Region (Hoshi et al., 2007). Beide Proteine werden für die glial-axonalen Protein-Lipid-Interaktion benötigt.

Sulfatid könnte auch an der Rekrutierung von Proteinen an die Myelin-Membran beteiligt sein, wie z.B. im Falle von NF 155. Dies zeigen Veränderungen in der Zusammensetzung von Lipid-Rafts in CGT-Knockout-Mäusen (Schafer et al., 2004; Schafer & Rasband, 2006).

Interessanterweise zeigten Myelin- und Lymphozyten Protein (MAL)-defiziente-Mäuse ähnliche Veränderungen der Nerven (Schaeren-Wiemers et al., 2004). MAL ist ein *tetraspan* Lipid-Raft Protein, das eine Rolle bei der Bildung von Membran-Microdomänen im Myelin spielt (Erne et al., 2002). Bei einer MAL-Defizienz ist der Transport von Sulfatid zu den „paranodalen Lipid Rafts“ (kleine, bewegliche, dicht gepackte Mikrodomänen, zum größten Teil bestehend aus Glykosphingolipiden und Cholesterol; Brown & London, 1998; Simons & Toomre, 2000; Simons & Vaz, 2004) beeinträchtigt und ruft somit eine Störung der glial-axonalen Zellverbindung hervor (Schaeren-Wiemers et al., 2004).

1.5 Lysosomale Speichererkrankungen

Unter dem Begriff lysosomale Speicherkrankheiten wird eine Gruppe von ca. 40 Erkrankungen zusammengefasst. In den meisten Fällen handelt es sich um genetische Defekte lysosomaler Enzyme. Die Defekte, die die Abbauproteine betreffen, führen hauptsächlich dazu, dass die Abbauwege in den Lysosomen stark gestört sind. Die klinischen Konsequenzen, die durch eine solche Abbau-Defizienz folgen, hängen von den jeweils betroffenen Zelltypen ab. Infolge des Enzymdefektes kommt es zur Akkumulation nicht abbaubarer Substanzen in den Lysosomen. Die daraus resultierenden Krankheiten werden Speicherkrankheiten genannt. Nach der Speichersubstanz werden sie Sphingolipidosen genannt, von denen bisher ca. 40 Varianten bekannt sind (Vellodi, 2005). Mit Ausnahme der Fabrerschen Erkraunkung werden Sphingolipidosen autosomal resessiv vererbt.

In der folgenden Tabelle 1 werden einige der Lysosomalen Speicherkrankheiten zusammengefasst.

Tabelle 1. **Verschiedene Glykosphingolipid-Speicherkrankheiten**. Dargestellt sind die jeweilige Speicherkrankheit mit dem entsprechenden Enzym-Defekt und die daraus resultierende Speichersubstanz.

Lysosomale Krankheit	**Defektes Enzym**	**Speichersubstanz(en)**	**Betroffene Organe**
Farbersche Krankheit (Ceramidose) (Iwamori & Moser, 1975)	Ceramidase	Ceramid	Viscera und Gehirn
Niemann-Picksche Krankheit (Elleder, 1989) (Sphingomyelinose)	Sphingomyelinase	Sphingomyelin	Viscera und Gehirn bei Typ A
Gauchersche Krankheit (Glucocerebrosidose) (Brady et al., 1965)	Glucocerebrosid-β-Glucosidase (Glucosylceramid-β-Glucosidase)	Glucosylceramid	Viscera und Gehirn (bei infantiler Form)
Krabbesche Krankheit (Glucocerebrosidose) (Miyatake & Suzuki, 1972)	Galaktocerebrosid-β-Galaktosidase (Galaktosylceramid-β-Galaktosidase)	Galaktosylceramid	Gehirn (weiße Substanz)
GM1-Gangliosidose (Jatzkewitz & Sandhoff, 1963)	Gangliosid-GM1-β-Galaktosidase	Gangliosid GM1; Keratansulfat	Gehirn viscerale Organe
Fabrysche Krankheit (Gieselmann, 1995)	α-Galaktosidase A	α-Galaktosylgalaktosyl-ceramid und α-Galaktosyllactosylcera-mid	viscerale Organe
GM2-Gangliosidose, Variante B (Tay-Sachssche Krankheit) (Sandhoff, 1969)	Hexosaminidase A	Gangliosid GM2	Gehirn (graue Substanz)
GM2-Gangliosidose, Variante 0 (Sandhoff & Kolter, 1995)	Hexosaminidasen A und B	Ganglioside GM2 und G A2	Gehirn Viscera
Metachromatische Leukodystrophie (Sulfatidose) (Gieselmann et al., 1998) und Austinische Krankheit (Schmidt et al., 1995)	Sulfatid-Sulfatase (Arylsulfatase A)	Sulfatid	Gehirn (weiße Substanz) und Niere

Da der Abbau der Glykosphingolipide streng sequentiell erfolgt, führt der Ausfall bereits eines Enzyms zu einer Blockierung der gesamten Abbaukaskade. Alle Substanzen werden nur bis zu dem blockierten Schritt abgebaut und nicht mehr abbaubare Lipidsubstrate reichern sich intralysosomal an. Im Normalfall erfolgt der konstitutive Abbau der Glykosphingolipide in den späten Endosomen und Lysosomen (Sandhoff et al., 1977 & 1995). Von den Glykolipiden werden die Zuckerreste vom nichtreduzierenden Ende her abgespalten. Da einige terminale Zucker vor dem Zugriff der Exohydrolasen geschützt sind (wie z.B. bei Sulfatid), werden sogenannte Aktivator-Proteine benötigt. Diese Sphingolipid-Aktivatorproteine A, B, C und D, kurz SapA, -B, -C und –D entstehen durch Proteolyse aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein, dem Prosaposin.

Nach der Zuckerabspaltung entsteht Ceramid, welches zu Sphingosin und einer langkettigen Fettsäure abgebaut wird. Die so entstandenen Sphingosin-Basen, Fettsäuren und Monosaccharide verlassen dann das Lysosom.

Eine der häufigsten Sphingolipidosen ist durch die Defizienz der ß-Glukocerebrosidase und somit durch die Anreicherung von Glucosylceramid gekennzeichnet (Brady et al., 1965; Patrick A.D., 1965; Beutler & Grabowski, 1995). Diese Krankheit wird die Gauschersche Erkrankung genannt (s. Tabelle 1, Abb. 1.7). Um neuronale Erkrankungen handelt es sich bei der Krabbeschen Krankheit sowie bei den Gangliosid-Speicherkrankheiten. Bei der Krabbeschen Krankheit führt das Fehlen der lysosomalen Galaktocerebrosidase zum fast vollständigen Abbau des Myelins (Suzuki & Suzuki, 1970; Suzuki et al., 1995). Verursacht wird dies durch den erhöhten Anteil von Psychosin, dem Lysolipid Derivat von Galaktosylceramid in den Myelinlipiden, was in der Zerstörung der myelinbildenden Oligodendrozyten resultiert. Bei den Gangliosid-Speicherkrankheiten, wie z.B. der GM2-Gangliosidose, liegt ein Defekt bei dem Enzym Hexosaminidase A und/oder B vor und führt zur Speicherung von Gangliosid GM2 in der grauen Substanz des Gehirns (Gravel et al., 1995; Sandhoff et al., 1989).

Beim Menschen sind zahlreiche Glykosphingolipid-Speicherkrankheiten (s. Tabelle 1) bekannt, die bis auf eine alle Schritte des Glykosphingolipid-Abbaus betreffen (Abb. 1.7).

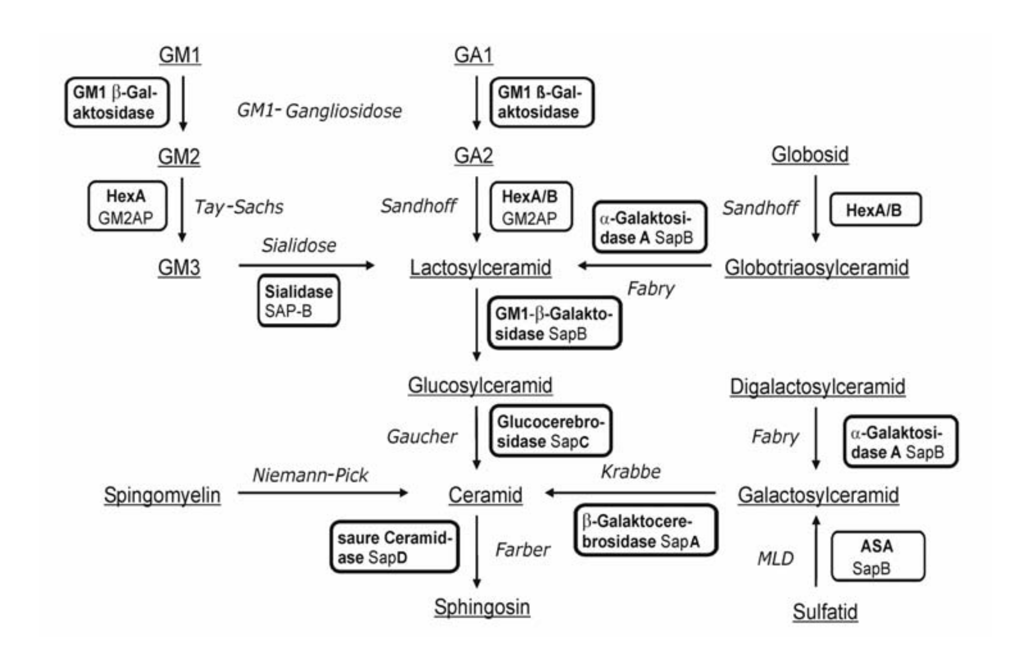


Abb. 1.7: Abbau der Sphingolipide und der dazu gehörigen Speichererkrankungen. Die einzelnen Metabolite sind unterstrichen, die Namen der mit dem jeweiligen Abbauschritt verbundenen Erbkrankheiten kursiv, die der beteiligten Proteine umrandet dargestellt. (MLD: Metachromatische Leukodystrophie, ASA: Arylsulfatase A, Hex: Hexosaminidase, GM2AP: GM2-Aktivatorprotein, Sap: Sphingolipid-Aktivatorprotein).

1.6 Metachromatische Leukodystrophie (MLD)

Die Leukodystrophien sind genetisch bedingte progressive Krankheiten, die das Gehirn, das Rückenmark und umliegende Nerven betreffen. Der Terminus "Leukodystrophie" leitet sich von "leuko" [griechisch] = weiß und "dystrophien" [griechisch] = fehlerhaft ab.

Die Metachromatische Leukodystrophie, kurz MLD, ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung aus der Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten. Bei Neugeborenen wird eine Inzidenz von 40.000 bis 100.000 geschätzt (Gustavson & Hagberg, 1971; Heim et al., 1997). Aufgrund des Fehlens von aktiver Arylsulfatase A (ASA) liegt ein gestörter Abbau des 3-0-Sulfogalaktosyl-ceramid (Sulfatid) vor (Austin et al., 1963) und es kommt zur Sulfatid-Akkumulation im Nervensystem, hauptsächlich in Oligodendrozyten, Schwann-Zellen und Phagozyten, aber auch in Astrozyten und Neuronen (von Figura et al., 2001). Ebenso wurde in den Nieren sowie in der Gallenblase und den Gallengängen Sulfatid-Anreicherung beobachtet (von Figura et al., 2001; Jatzkewitz, 1958; Jatzkewitz et al., 1970).

Abb. 1.8: Die Desulfatierung von Sulfatid durch die Arylsulfatase A ist der erste Schritt des Abbaus von Sulfatid.

Die Störungen dieses Abbaus können zum einen durch Mutationen in der Arylsulfatase und zum anderen durch eine Defizienz des Aktivatorproteins Saposin B (Shapiro et al., 1979) verursacht werden. Alleine 115 Mutationen der Arylsulfatase sind bis heute bekannt (Gieselmann, 1998). Mit Hilfe von Saposin B, das als membranaktiver Co-Faktor des lysosomalen Glykosphingolipidkatabolismus agiert (Kishimoto et al., 1992; Kolter & Sandhoff, 2005), wird das Sulfatid aus der Membran gelöst und dem ASA-Enzym für die Abspaltung der Sulfatgruppe verfügbar gemacht.

Es gibt drei klinische Subtypen von MLD, die sich in erster Linie im Zeitpunkt des Ausbruchs der Krankheit unterscheiden. In allen Fällen kommt es zu einem fortschreitenden Verlust der physischen und intellektuellen Funktionen über einen relativ langen Zeitraum.

Die drei Formen sind die spät infantile, die juvenile und die adulte Form.
Die spät-infantile Form tritt im Alter zwischen 6 Monaten und 2 Jahren auf. Die Patienten erkranken mit dem Verlust des bereits erlernten Gehens sowie des Stehens. Im weiteren Verlauf treten Dysarthrie und Aphasie auf. Ebenso nimmt die Sehfähigkeit vermehrt ab. Weitere Symptome sind eine Verfärbung der Makula sowie eine fast vollständige Störung der Koordinations-Bewegung. Es folgen Erblindung, Erschlaffung der Gliedmaßen, die zur Tetraplegie führen und schließlich Dezerebration.
Nach Ausbruch der klinischen Symptome tritt nach ungefähr fünf Jahren der Tod des Patienten ein (von Figura et al., 2001).
Die juvenile Form tritt zwischen dem vierten und sechzehnten Lebensjahr auf. Zu Beginn der Krankheit machen sich eine Verschlechterung der schulischen Leistung, undeutliche Sprache, Gangstörungen, Inkontinenz und Persönlichkeitsstörungen bemerkbar. Im weiteren Verlauf entwickeln die Patienten Ataxie (Störung der Bewegungsform) und Tetraplegie. Schließlich kommt es zur Dezerebration und die Patienten sterben meist, bevor sie das 20. Lebensalter erreicht haben.
Bei der Spät/adulten Form tritt die Erkrankung zwischen der Pubertät und dem Senium (bis ca. 63. Lebensjahr) ein. Die ersten auffälligen Symptome sind eine Verschlechterung der intellektuellen Fähigkeiten in Schule und Beruf, eine Störung der Persönlichkeit, Gedächtnisverlust und auch psychotische Symptome wie Halluzinationen. Weiterhin kommt es zu Bewegungsstörungen, spastischer Lähmung von Armen und Beinen, Erblindung und Inkontinenz. Diese Form der MLD kann innerhalb weniger Jahre zum Tode führen, sich aber auch bis zu Jahrzehnten hinziehen. Diese drei Formen der MLD sind bedingt durch verschiedene Mutationen. Es sind zahlreiche Mutationen des ASA kodierenden ASA-Gens auf dem Chromosom 22 bekannt (Kreysing et al., 1990).
Die Unfähigkeit, Sulfatid abzubauen resultiert in einer intralysosomalen Speicherung, welche bereits makroskopisch und mittels einer speziellen Färbung (Alcianblau-Färbung) erkennbar ist (Wittke et al., 2004; Ramakrishnan et al., 2007). Eine Reduzierung der weißen Substanz des zentralen Nervensystems sowie des Myelins in den peripheren Nerven ist sichtbar (von Figura et al., 2001). Eine veränderte Zusammensetzung der weißen Substanz liegt vor. Der Anteil von Sulfatid ist erhöht, aber der Anteil von anderen Lipiden wie Cholesterin, GalCer und Sphingomyelin ist verringert.
Es ist noch unklar, wie die Akkumulation von Sulfatid zur Demyelinisierung der Nervenleitung und zum Verlust der Nervenzellen führt (Gieselmann, 2003). Die Akkumulation ist aber nicht nur auf die lysosomalen Kompartimente beschränkt, sondern

auch im Myelin zu finden (Saravanan et al., 2004). Inwiefern sich nun diese intrazelluläre Speicherung und/oder die erhöhte Menge an Sulfatid in der Plasmamembran auf die Krankheit auswirkt, muss noch geklärt werden.

1.6.1 Therapie-Ansätze der Metachromatischen Leukodystrophie

Zurzeit sind mögliche Therapieansätze für die MLD stark begrenzt. Eine Form der Therapie ist die Knochenmark-Transplantation. Hierzu werden gesunde Zellen von Spender-Personen in das Knochenmark der erkrankten Person transplantiert. Die gesunden Zellen sollen funktionell aktive ASA sezernieren (Kornfeld et al., 1992). Jedoch scheint diese Form der Therapie bei Patienten, die bereits Symptome entwickelt hatten, nicht wirksamen zu sein (von Figura et al., 2001).

Ein deutlicherer Effekt kann mit Hilfe der viralen Transduktion erreicht werden. Nach retroviraler Transduktion der transplantierten Zellen konnte eine erhöhte Menge an ASA in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (Learish et al., 1996). Allerdings war die Sulfatidkonzentration in Nieren und Gehirn unverändert, in der Leber um 1/3 erniedrigt. Aus den Untersuchungen ging hervor, dass eine mindestens 200 %ige ASA-Enzymaktivität notwendig wäre, um eine wesentliche Reduktion der Sulfatidkonzentration in Leber und Niere zu erreichen (Matzner et al., 2002).

Untersuchungen, basierend auf der Injektion von adenoviralen Vektoren ergaben, dass eine ASA-Überexpression in Oligodendrozyten vorhanden war. Jedoch konnte keine pathologische Veränderung beobachtet werden. Nur im frühen Stadium der Krankheit bei ASA-defizienten Mäusen konnte ein Rückgang der Sulfatid-Akkumulation beobachtet werden (Sevin et al., 2007). Dies deutet daraufhin, dass ein Gentherapie-basierter Ansatz keinen wesentlichen histologisch nachweisbaren Effekt auf die Sulfatid-Speicherung hat.

Bei der Enzymersatztherapie wird rekombinant hergestellte humane ASA systemisch injiziert. In ASA-defizienten Mäusen führte dies zur Reduzierung der Sulfatidspeicherung in den peripheren Nerven, im Gehirn und im Rückenmark (Matzner & Gieselmann, 2005). Eine weitere Möglichkeit zur Therapie der MLD ist die Inhibition der Cerebrosid-Sulfotransferase. Die Hemmung dieses Enzyms könnte zu einer verminderten Bildung und somit zu einer verminderten Akkummulation von Sulfatid führen.

1.7 Mausmodelle der metachromatischen Leukodystrophie

Metachromatische Leukodystrophie ist eine genetische Erkrankung und wurde nur für den Menschen beschrieben. Daher gibt es in der Natur kein geeignetes Tiermodell (Gieselmann, 1998; 2003). Zur Klärung der Funktion von Genen und deren Produkten *in vivo* können Mausmutanten erzeugt werden, in welchen gezielt eine Gen-Defizienz (sog. *Knockouts*, engl.) oder fremde Gensequenzen in das Genom eingebracht werden. Daher wurde zur Erforschung der menschlichen MLD eine ASA-defiziente-Maus-Linie erzeugt (Hess et al., 1996). Das Maus ASA-Gen ähnelt dem humanen Gen sehr (Kreysing et al., 1994).
Dieses ASA-Knockout-Mausmodell zeigt einige Charakteristika der humanen MLD, aber im Vergleich zum Patienten einen milderen Phänotyp. Die Tiere speichern Sulfatid in denselben Geweben wie die Patienten, einschließlich Oligodendrozyten, Schwann-Zellen und Astrozyten (Coenen et al., 2001; Gieselmann et al., 1998; Lüllmann-Rauch et al., 2001). Mit steigendem Alter zeigen die Tiere auch einen erhöhten Gehalt an Sulfatid und bereits nach 12 Monaten zeigen sich Verhaltensänderungen und neurologische Symptome mit Gangstörung und neuronaler Degeneration des akustischen Ganglions (Hess et al., 1996; Gieselmann et al., 1998; D´Hooge et al., 1999a; 2001). Genauere Untersuchungen der neuromotorischen Fähigkeiten zeigten, dass bereits nach sechs Monaten eine Verhaltensänderung auftritt. Diese gehen einher mit dem Beginn der Sulfatid-Akkumulation in diesem Alter, welche vor allem in der weißen Substanz stattfindet (Yaghootfam et al., 2005; Stroobants et al., 2008). Dennoch zeigen die ASA-defizienten-Mäuse, abgesehen von axonaler Degeneration, keine umfassende Demyelinisierung. Die Gründe für diese Diskrepanz sind noch unklar. Ein möglicher Grund könnte zum einem das Lebensalter der Mäuse und zum anderen die Spezies-spezifischen Unterschiede im Sphingolipid-Metabolismus sein.
Um die Anwendbarkeit des MLD-Mausmodells zu verbessern, war die nächste Möglichkeit die Synthese von Sulfatid zu steigern. Der selektive Anstieg von Sulfatid-Speicherung in Neuronen wurde erreicht durch die transgene Überexpression von Cerebrosid-Galaktosylsulfotransferase (CGT) unter dem neuronalen Promotor Thy-1 (Eckhardt et al., 2007). Die Thy1-CGT Mäuse zeigen eine progressive axonale Degeneration, die mit einem Anstieg von Sulfatid in den Neuronen und motorischen Koordinations-Defiziten einhergeht. Unabhängig von ihrem genetischen Hintergrund weisen diese Mäuse eine signifikant verkürzte Lebensspanne auf, wobei der Tod sehr plötzlich auftritt. Zusätzlich zeigen die transgenen CGT-Mäuse ein unruhiges Verhalten, das auf eine mögliche Überregbarkeit der Neuronen zurückzuführen ist. Allerdings konnte die Ursache noch nicht geklärt werden.

Erste Hinweise bezüglich der Überregbarkeit von Neuronen, wurden bei den ASA-defizienten-transgenen CGT-Mäusen beobachtet. Diese Mäuse wiesen eine erhöhte Sulfatid-Akkumulation im Gehirn sowie eine gesteigerte Sulfatid-Speicherung in den zentralen und peripheren Neuronen auf (Eckhardt et al., 2007). Die transgenen CGT/ASA-defizienten-Mäuse entwickelten zudem neuromotorische Koordinations-Defizite. Untersuchungen der Nervenfasern ergab eine Degeneration der Nerven im Rückenmark. Des Weiteren konnte anhand von EEG-Messungen bei den transgenen CGT/ASA-defizienten-Mäusen eine kortikale Hyperexzitabilität (Überregbarkeit) festgestellt werden (Eckhardt et al., 2007).

1.8 Zielsetzung

Ein für die Analyse der MLD wichtiges Tiermodell stellt die Knockout-Maus dar, in der das ASA-Gen inaktiviert wurde.
Bei X. Han (2007) wurde beschrieben, dass Sulfatid möglicherweise durch Apolipoprotein-E von Astrozyten zu Neuronen transportiert wird und dass eine ApoE-Defizienz zu einem erhöhten Sulfatid-Gehalt im Cortex führt (Han et al., 2004; 2007).
Anhand einer ASA- und ApoE-defizienten Maus soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob das zusätzliche ApoE-Defizit eine Veränderung des Sulfatid-Gehalts bewirkt. Dabei soll der Fokus auf den Neuronen liegen und somit analysiert werden, ob die Neuronen mit Hilfe des ApoE-Proteins Sulfatid erhalten oder aber eigenes Sulfatid produzieren.

Ein weiteres Ziel ist die Analyse des transgenen MLD-Mausmodells Thy1-CGT.
Die transgenen Thy-1-Mäuse überexprimieren UDP-Galactose:Ceramid Galactosyltransferase (CGT) unter der Kontrolle des Thy1.2 Promotors, wodurch es zu einer Sulfatid-Anreicherung in den Neuronen kommt. Dadurch sollten neurologische Effekte, die die Sulfatid-Speicherung in den Neuronen möglicherweise auslöst, analysiert werden.
Erste Untersuchungen an transgenen Mäusen deuten darauf hin, dass die Sulfatid-Speicherung einen Effekt auf die funktionellen Eigenschaften von neuronalen Membranen hat (Eckhardt et al., 2007).
In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen der Überexpression von CGT auf den Sulfatid-Gehalt in Neuronen bestimmt werden. Weitere Untersuchungen, wie Verhaltensexperimente an Thy-1-CGT-Mäusen und Lipid-Analysen der neuronalen Plasmamembran sollen weitere Erklärungen für die neurologische Übererregbarkeit liefern.

Ein zusätzliches Projekt dieser Arbeit ist die Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung der Cerebrosid-Sulfotransferase (CST). Die Inhibition der CST könnte zur Reduzierung der Sulfatid-Menge bei MLD-Patienten führen. Hierzu ist die Produktion größerer Mengen CST notwendig, um detaillierte Strukturanalysen vorzunehmen, deren Kenntnisse es bedarf, um potentielle Inhibitoren zu finden und zu testen.
Voruntersuchungen zeigten jedoch, dass eine lösliche Variante der CST (ohne N-terminale Transmembran-Domäne) nur sehr ineffizient sezerniert wird. Daher sollen verschiedene Konstrukte erstellt werden, indem einzelne Aminosäuren bzw. Bereiche des Enzyms entfernt werden sowie einige Fusionsproteine von sekretorischen Proteinen mit der CST hergestellt werden, um ein Sekretion des CST zu bewirken. Zusätzlich sollen die Auswirkung auf die Enzymaktivität, Stabilität und subzelluläre Lokalisation bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kulturmedien wurden von den Firmen Applied Biosystems, Biorad, Gibco, Merck, MoBiTec, Molecular Probes, Amersham Pharmacia Biotech, Qiagen, Fermentas, Roth und Sigma bezogen. Sie hatten, sofern nicht anders angegeben, die Reinheitsgrade »p.a.«, »reinst« bzw. »für mikrobielle Medien«.
Restriktionsendonukleasen stammten von der Firma Fermentas.
Alle wässrigen Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einer MilliQ/UF-Ultrafiltrationsanlage (Millipore) aufbereitet wurde. Sterilisiert wurde durch autoklavieren bzw. sterilfiltrieren.

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

2.1.1.1 Geräte

Gerät	Firma
Agarosegelkammern mit Zubehör	Eigenbau, Biorad
Brutschränke	Forma Scientific, Thermo Electron, Dreireich
Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresekammern für PAGE	Mini Protean Gelkammern, Biorad, Hercules, CA, USA Groß: Proteax Xi, Biorad, Hercules, CA, USA
ESI-MS	HCT-Ultea, Bruker
Filmentwickler	Automat Curix 60, AGFA, Mortsel, Belgien
Gefriertruhe (-80)	Sanyo Ultra low, Sanyo Scientific, Bensenville/Illinois, USA
Gefrierschrank (-20)	Öko Arctis Super electronic, AEG, Nürnberg
Heizblock	Stuart Scientific, Newcastle, UK
Kühlschrank (+4°C)	Öko Santo Superelectronic, AEG, Nürnberg
Kühlblock für Enzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
Kryostat	Leica CM 1510S, Leica, Wetzlar
Magnetrührer Ikamag RET	Ika-Werke, Staufen, Deutschland
MALDI Voyager-DE STR mass spectrometer	PE Biosystems, Warrington, Chesire, UK
Mikroplatten-Lesegerät	GENios, Tecan, Zürich
Mikroskop	Lichtmikroskop: Zeiss Telaval 31, Carl Zeiss AG Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axiovert 100M, Axiocam HRm, Carl Zeiss AG, Oberkochen
PCR-Gerät	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen
Phosphoimager BAS-1800II	Fujifilm, Straubenhardt
Präparierbesteck	neoLab, Heidelberg
Reacti Therm „Heating and stirring module“	Pierce, Rockfort, Illinois, USA

Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Edison/New Jersey, USA
Spectrophotometer DU 640	Beckmann, München
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
	Clean Air Technik, JA Woerden, Niederlande
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
„TLC-Sampler“ 4	Camag, Berlin
Ultraturrax	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen
Ultraschallwasserbad	Bransonic, Branson, Danbury/Connecticut, USA
UV-Handlampe	Konrad Benda Laborgeräte und UV-Strahler, Wiesloch, Deutschland
Vakuumpumpe HCL-Haep	Labor Consult MP 280, Bovenden
Vortexer Unimag Zx3 Classic	UniEquip, Martinsried
Waagen	PC 4400, Mettler, Giessen, Schweiz
	CP12S-0CE, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	1083, GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Eppendorf Zentrifuge 5415 D, Eppendorf, Eppendorf Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg
	Beckmann CPKR Zentrifuge, Beckmann, Beckmann Ultrazentrifuge Optima TLX 120000 rpm, Rotor TLN 100, Beckmann, München
	Heraeus Labofuge 400e (Zellkultur), Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
DC-Aluminiumfolien 20x20cm Kieselgel 60 F254	Merck, Darmstadt
DC-Platten 20x20 cm Kieselgel 60,	Merck, Darmstadt
Gefrierröhrchen	Cellstar Cryo, Greiner, Frickenhausen
Küvetten	Sarsted, Nümbrecht
6/24er-Loch Mikrotiter-Platten	Sarsted, Nümbrecht
Pipetten PipetmanP	Gilson, Middleton,
Quarz-Küvette	Hellma®, Mühlheim
Zellkulturflaschen	Sarsted, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Sarsted, Nümbrecht
Zählkammer (Neubauer) für eukaryontische Zellen	VWR, Darmstadt

2.1.2 Substanzen

Name	Firma
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alcian blue 8x	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	JTBaker, Phillipsburg/ New Jersey, Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
DPX Mounting Medium for Histology	Fluka, Buchs
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Buchs
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
ExGen	Fermentas, St. Leon-Rot
Glaswolle	Sigma-Aldrich, Steinheim

Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Histo Green	Linaris, Wertheim - Bettingen
n-Hexan	Merck, Darmstadt
LiChroprep® RP-18 (40-63 µm)	Merck, Darmstadt
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Kaiser Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schüll
Magnesiumchlorid	Fluka, Buchs
Milchpulver	Reformhaus
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
NBT/ BCIP-Stocklösung	Roche, Grenzach-Wyhlen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Polyvinylalkohol	Fluka, Buchs
Ready-Load TM 1 Kb Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Röntgenfilme	Fujifilm
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Biorad, München
Stickstoff (flüssig)	Linde Gas, Pullach
Tris ultra pur	Gibco / Invintrogen, Karlsruhe
Tryptone-Peptone	Difco, Detroit / Michigan, USA
Tween 20	Fluka, Buchs
Vectastain ABC-Kit	Linaris, Wertheim - Bettingen
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll

2.1.3 Kits

Kit	Firma
QIAprep DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Mini Preparation Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Midi Preparation Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4 Nährmedien und Bestandteile für Bakterien

Name	Firma
Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Ditroit/ Michigan, USA
Trypton	Oxoid, Hampshire, England
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
G418	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5 Zellkultur

2.1.5.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Name	Firma
B27-Supplement	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco´s modified minimal essential medium (DMEM)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
DMEM/F-12	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Fetal Calf Serum (fötales Kälber-Serum)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma-Alderich, Steinheim
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate-Buffered Saline (PBS), 10x	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe

Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin (Trypsin/EDTA Lösung 1x)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Trypan Blau Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5.2 Zelllinien

Die Tabelle gibt die Zelllinien an, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Von allen Zellen wurde regelmäßig Überstand abgenommen und per PCR auf Mycoplasmen kontrolliert.

Name	**Anmerkung**
CHO-K1 (Chinese hamster ovary)	Puck et al., 1958
CHO-GalT	von CHO-K1 abgeleitete Zelllinie, stabil mit der Ceramid-Galaktosyltransferase aus Ratte transfiziert (Stahl et al., 1994)
CHO-Sulf	von CHO-GalT abgeleitet Zelllinie, zusätzlich mit der Cerebrosid-Sulfotransferase aus Maus transfiziert (Eckhardt et al., 2002)
CHO-39CST	von CHO-K1 abgeleitete Zelllinie, stabil mit der um sechs Basenpaare verkürzten Cerebrosid-Sulfotransferase aus Maus transfiziert
HT 1080 humane Fibrosarcoma	Rasheed S. et al., 1974

2.1.6 Software

Datenverarbeitung	Office-Windows^{2000}, -Windows^{XP}
Bildbearbeitung	AxioVision Rel. 4.6, Zeiss
	Adobe Photoshop 7.0
	Corel Draw 12
	Aida Software
Statistik	Statistica

2.1.7 Lösungen

2.1.7.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

Name	Zusammensetzung
LB (Luria Bertani)- Medium	10 g/l Trypton
	10 g/l NaCl
	5 g/l Hefeextrakt

Name	Zusammensetzung
SOC- Medium	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM $MgCl_2$
	20 mM $MgSO_4$
	20 mM Glukose
	0,5% Hefeextrakt
	2% Trypton
LB-Agarplatten	LB-Medium
	15 g/l Agar

2.1.7.2 Antibiotika Stammlösung

Antibiotika	Konzentration
Ampicillin:	Stammlösung: 25 mg/ml in H_2O
	Arbeitskonzentration: 50 µg/ml
Chloramphenicol:	Stammlösung: 10 mg/ml in H_2O
	Arbeitskonzentration: 20 µg/ml

Kanamycin:	Stammlösung: 10 mg/ml in H_2O Arbeitskonzentration: 20 µg/ml
Lysostaphin	Stammlösung: 2,5 mg/ml in H_2O Arbeitskonzentration: 100 µg/ml
Genatamicin	Stammlösung: 50 mg/ml in H_2O Arbeitskonzentration: 15 µg/ml
G418	Stammlösung: 50 mg/ml in H_2O Arbeitskonzentration: 700 µg/ml

2.1.7.3 Lösungen und Puffer für die Immunfärbung

Lösung	**Zusammensetzung**
150 mM NaCl-Lösung	0,44 g in 50 ml H_2O → steril filtrieren
PBS	9,55 g/l PBS
Waschpuffer	PBS / dest. H_2O
Permeabilisierungspuffer	0,3% TritonX-100 in PBS
Blockingpuffer	0,3% Gelatine in PBS 1% BSA in PBS
4% Paraformaldehyd	4 g Paraformaldehyd 100 ml PBS
Inaktivierung endogener Peroxidase Aktivität	0,3% H_2O_2 / PBS
Reduktion freier Aldyhedgruppen	0,5% Glycin / PBS

Permeabilisierungs-/Blockingpuffer (für den Nachweis von Sulfatid in Gewebe)	0,05% Tween 20, 1% BSA / PBS

2.1.7.4 Lösungen für molekularbiologische und biochemische Methoden

Lösung	**Zusammensetzung**
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA
50 x TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 2 mM Na_2EDTA, pH 8,5
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in bidest. H_2O
Lysispuffer (Zellen)	1% Triton X-100 oder NP-40 20 mM Tris-HCl pH 8 50 mM NaCl 5 mM EDTA 1 mM PMSF (frisch dazu geben
Homogenisierungs-puffer (Gewebe)	TBS (kalt) 1 mM PMSF in H_2O, 4°C
Acrylamid 40% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
APS 10% (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
ECL-Lösung	2,5 mM Luminol (Fluka) in DMSO 0,4 mM p-Coumarsäure (Fluka) in DMSO 100 mM Tris-HCl pH 8,5 30% H_2O_2 (frisch dazu)

10 x Laufpuffer	250 mM Tris-Base 1,9 M Glycin 1% SDS; pH auf 8,6 einstellen
4 x Probenpuffer	8% SDS 40% Glycerol 240 mM Tris-HCl, pH 6,8 4% Bromphenolblau 4% β-Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer	500 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS
Blotpuffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin auf pH 8,5 einstellen 0,037% SDS 20% (v/v) Methanol
2 x SEAP-Puffer	21 g Diethanolamin 100 µl 1M $MgCl_2$ mit HCl auf pH 9,8 mit einstellen ad 100 ml H_2O
SEAP-Substrat-Lösung	20 mg p-Nitrophenolphosphat auf 5 ml 1x SEAP-Puffer
3 M NaOH	6 g NaOH ad 50 ml H_2O

Ponceau-Lösung	0,2% Ponceau S 3% Trichloressigsäure
TBS/T	1 x TBS 0,5% Tween 20
10 x PBS	100 mM Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4, pH 7,4 1,5 M NaCl 25 mM KCl
10 x TBS	100 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 300 ml 5 M NaCl auf 1 l mit destilliertem H_2O auffüllen, pH 8,0
DEPC-H_2O bidest.	H_2O wird mit 0,1% DEPC gemischt, über Nacht bei RT gerührt und 2x autoklaviert
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH wird auf 7,0 eingestellt
Hybridisierungs- puffer *In-situ*	50% Formamid 1% Denhardt`s Lösung 0,2% SDS 0,25 mg/ml Lachsspermien-DNA 10% Hybridisierungssalz (3 M NaCl, 0,1 M PIPES, 0,1 M EDTA)
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer 0,3% Tween 20

AP-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9,5 frisch ansetzen 100 mM NaCl 50 mM $MgCl_2$
DC-Färbelösung	625 mM Kupfersulfat 9,4% konzentrierte Phosphorsäure
DC-Laufmittel (Sphingolipid-Auftrennung)	60 ml Chloroform 27 ml Methanol 4 ml H_2O
DC-Laufmittel (Gangliosid-Auftrennung)	60 ml Chloroform 35 ml Methanol 8 ml 0,22% $CaCl_2$
NBT / BCIP -Lösung	200 µl der NBT/ BCIP-Stocklösung (Roche) in 10 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl 0,05 M $MgCl_2$ verdünnt.
0,3% Plexigum	3% Polyisobutylmethacrylat („Plexigum“) 1:10 in n-Hexan verdünnt
Reaktionspuffer CST-Assay	100 mM Tris-HCl (pH 7.0) 20 mM $MgCl_2$ 2,5 mM ATP 20 µM PAPS/ [^{35}S]-PAPS (~ 5000 MBq/mmol)
TUB (“theroretical upper phase”)	Methanol (48 Teile) 150 mM NaCl (47 Teile) Chloroform (3 Teile)

2.1.8 Bakterienstämme

Bezeichnung	**Herkunft**
E.coli XL1-blue	Bullock et al., 1987

supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi-1

2.1.9 Verzeichnis der Plasmide

Plasmid	**Herkunft / Erläuterung**
pBluescript	Klonierungsvektor mit T3- und T7-Promotor, Stratagene
pcDNA3.1	Klonierungsvektor, Strategene; Ausgangsvektor für CST-Konstrukte
pEF	Klonierungsvektor, Invitrogen; Ausgangsvektor für CST-Konstrukte
psB 4.7	Klonierungsvektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. T. Dierks, Göttingen (für die Selektion in $DHFR^-$ Zellen)
pEF-IL-39-CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase ohne Transmembran-Domäne und um 6 Basenpaare verkürzt mit Interleukin-2 als Signalpeptid
pEF-IL-42-CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase ohne Transmembran-Domäne und um 9 Basenpaare verkürzt mit Interleukin-2 als Signalpeptid
pEF-IL-45-CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase ohne Transmembran-Domäne und um 12 Basenpaare verkürzt mit Interleukin-2 als Signalpeptid
pEF-IL-48-CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase ohne Transmembran-Domäne und um 15 Basenpaare verkürzt mit Interleukin-2 als Signalpeptid
pEF-IL-51-CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase ohne Transmembran-Domäne und um 18 Basenpaare verkürzt mit Interleukin-2 als Signalpeptid

psB4.7-39CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase ohne Transmembran-Domäne und um 6 Basenpaare verkürzt (für stabile Zelllinie in CHO-K1 Zellen genutzt)
pcDNA-AchE-Furin-CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase mit vorgeschalteter Acetylcholinesterase
pcDNA-Seap-Furin-CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase mit vorgeschalteter sekretorischer alkalischer Phosphatase
pcDNA3-39CST*	enthält die Cerebrosid-Sulfotransferase um 6 Basenpaare verkürzt
pcDNA3-Gal3ST1*	enthält Galactose-3-O-Sulfotransferase 1 (humane CST)
pcDNA3-Gal3ST2*	enthält Galactose-3-O-Sulfotransferase 2 (galβ-3GalNac-3-O-Sulfotransferase 2)
pcDNA3-Gal3ST4*	enthält Galactose-3-O-Sulfotransferase 4 (galβ-3GalNac-3-O-Sulfotransferase 4)
pcDNA3-DPPIV (TM)*	enthält die Transmembrandomäne der Dipeptidylpeptidase 4
pcDNA3-DPPIV-TM_39CST-HA*	enthält die DPPIV-TM und die 39CST, mit HA-Tag
pEGFP-C1	GFP am C-Terminus exprimiert; Klonierungsvektor, Stratagene
pEGFP-N3	GFP am N-Terminus exprimiert Klonierungsvektor, Stratagene

*Plasmidkarten siehe Anhang

2.1.10 Verzeichnis der Primer

Oligonukleotid-Primer wurden durch MWG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert, in sterilen H_2O gelöst, so dass eine Stammlösung von 100 pmol/µl vorlag, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Nummern entsprechen fortlaufend vergebenen Nummern der Instituts-internen Primer-Liste.

Tabelle 2.1 : **Verzeichnis der genutzten Primer**

lfd. Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Länge	eingesetzt für
1734	39 CST	CCCAACATGGCCTTCACGACC	21	Vektor-Konstrukt
1735	42 CST	GCCTTCACGACCTCAGAGGC	20	Vektor-Konstrukt
1736	45 CST	ACCTCAGAGGCTGCAGCACC	20	Vektor-Konstrukt
1737	48 CST	GCTGCAGCACCCTGCTCC	18	Vektor-Konstrukt
1738	51 CST	CCCTGCTCCCCTATTCCCAATG	22	Vektor-Konstrukt
1739	anti-IL2	AGGTGCACTGTTTGTGACAAGTGC	24	Vektor-Konstrukt
1740	anti-IL2-NEU	AGGTGCACTGTTTGTGACAAGTGCAAG ACTTAGTGC	36	Vektor-Konstrukt
1780	Maus CST1	ATGACTCTGCTGCCAAAGAAGC	22	Genotypisierung
1781	Maus CST2	CCACCTTAGAAAGTCCCTAAGG	22	Genotypisierung
1782	ASA sense	TAGGGTGGAAGTTACCCTAGA	21	Genotypisierung
1783	ASA anti	TGACCCAGGCCTTGTTCCCAT	21	Genotypisierung
1784	ASA Neo	GGAGAGGCTATTCGGCTATGAC	22	Genotypisierung
1826	T7_primer	GGTAATACGACTCACTATAG	20	Sequenzierungen
1842	CGTas1	GCGCTAGCGGCAATATCCAGTAGGAA ATACTGGC	34	Genotypisierung
1843	CGTas2	GCGCTAGCATACTGGCAGAAAGAGAT CTGATGG	33	Genotypisierung
1871	Rat-CGT-883	GCTGGTGTCAAGTATCTGTC	20	Sequenzierung
2193	CGT1455	GCTTATGTCCCAGAGTTTAACTCAC		RNA-Sonde
2194	IL-2 sense	CTAGCGCCATGTACAGGATGCAACTCC TGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACT TGTCACAAACAGTGCAAGC	74	Vektor-Konstrukt
2195	IL-2 anti	GCTTGCACTGTTTGTGACAAGTGCAAG ACTTAGTGCAATGCAAGACAGGAGTTG CATCCTGTACATGGCG	70	Vektor-Konstrukt
2215	Kpnl_Xbal_huA ChE	CTTGGTACCTCTAGAGCAGCCATGAGG CCCC	31	Vektor-Konstrukt
2216	Blunt_huAChE_ AS	TCTCAGGTCTGAGCAGCGATCC	22	Vektor-Konstrukt
2217	EcoRI_Eco47III_ m	CCTGAATTCAGCGCTAGATACAAAAGA CCCAACATGGCCTTCACGA	46	Vektor-Konstrukt
2218	Xbal_mCST_AS	CGCTCTAGATTACACCACCTTAGAAAG TCCCTAA	34	Vektor-Konstrukt
2337	CSTanti Seq.	GGTTGACACCCTCCTGCTGAGCCG	24	Sequenzierung
2338	IL2-sense-NheI	CTAGCCATGTACAGGATGCAACTCCTG TCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTG TCACAAACAGTGCAGAA	72	Vektor-Konstrukt
2339	IL2-anti-AgeI	CCGGTTCTGCACTGTTTGTGACAAGTG CAAGACTTAGTGCAATGCAAGACAGG AGTTGCATCCTGTACATGG	72	Vektor-Konstrukt
2350	39CST_Kpnl	GCGCGGTACCAGATCTGCCATGTACAG GATGCAACTC	37	Vektor-Konstrukt
2351	39CSTanti_EcoR I	CGCGAATTCACTTACCTGCCCACCTTA GAAAGTCCC	36	Vektor-Konstrukt
2540	T7se_CGTse	GTAATACGACTCACTATAGGGGCTTAT GTCCCAGAGTTTAAC	42	RNA-Sonden
2541	T7se_CGTanti	GCGCTCATCTCACCTTCTTTTCG	23	RNA-Sonden
2542	T7an_CGTan	GTAATACGACTCACTATAGGGTCATCT CACCTTCTTTTCG	40	RNA-Sonden
2543	T7se_cFosse	GTAATACGACTCACTATAGGGATGATG TTCTCGGGTTTCAACG	43	RNA-Sonden
2544	T7se_cFosan	CGCTCACAGGGCCAGCAGCGTGGGTG AG	28	RNA-Sonden

2545	T7an_cFosse	CGCATGATGTTCTCGGGTTTCAACG	25	RNA-Sonden
2546	T7an_cFosan	GTAATACGACTCACTATAGGGTCACAG GGCCAGCAGCGTGG	41	RNA-Sonden
2618	an39CST-HA_EcoRI	GCGCGAATCTCAGGCGTAATCGGGGA CG	28	Vektor-Konstrukt
2619	se39CST_KpnI	GCGCGGTACCCCCAACATGGCCTTCAC G	28	Vektor-Konstrukt
2620	Dpp_TMDse	GCGCAAGCTTATGAAGACACCGTGGA AGG	29	Vektor-Konstrukt
2621	DPPP_TMDan	GCGCGGTACCTTCATCTTTGCTCAGC	26	Vektor-Konstrukt
2690	GAL3ST1se	GCAAGCTTACCATGCTGCCACCGCAGA AGAAGC	33	Vektor-Konstrukt
2691	GAL3ST1an	GCGAATTCCCACCGCAGGAAATCGCG	26	Vektor-Konstrukt
2692	GAL3ST4se	GCAAGCTTACCATGGGCCCTCTCTCTC CTGCC	32	Vektor-Konstrukt
2693	GAL3ST4an	GCGAATTCTGGGGAGAGTGGCCTTGAA GTCTTGAG	35	Vektor-Konstrukt
2708	Gal3ST2se_neu	GGCAGGATAATGTCCATCCTGAGAGGC	27	Vektor-Konstrukt
2709	Gal3ST2an_neu	CTTAGCCAAACCCTACTTTTTCAGGAA TGGGA		Vektor-Konstrukt
2743	Adapter HAse	CGCGAATTCTACCCTTATGACGTCCCC GATTACGCCTAAGGGCCCGCG	48	Vektor-Konstrukt
2744	Adapter HAanti	CGCGGGCCCTTAGGCGTAATCGGGGAC GTCATAAGGGTAGAATTCGCG	48	Vektor-Konstrukt

2.1.11 Molekulargewichtsstandards

1 kb DNA-Standard GeneRuler Ladder (Fermentas)

100 bp DNA-Standard GeneRuler Ladder (Fermentas)

50 bp DNA-Standard GeneRuler Ladder (Fermentas)

Protein Standard Page Ruler Prestained Protein Ladder 671 (Fermentas)

2.1.12 Verzeichnis der Antikörper

Zur Detektion von Proteinen im Western-Blot und in der Immunohistochemie wurden folgende Antikörper verwendet:

Name	Verdünnung	Firma
Antiserum ST2	1:500 (IF)	
	Yaghootfam et al., 2007	
Polyklonaler anti-MBP aus Kaninchen	1:5000 (WB)	Chemicon
Na^+/K^+ ATPase aus Maus	1:1000 (WB)	DSHB*
Monoklonaler anti-Sulph I aus Mäusen	1:400 (IF)	P. Fredmann
Monoklonaler anti-NCAM aus Ratte, H28	50 µg/ml (WB)	Chemicon
Monoklonaler anti-NSE aus Ratte,	1:100 (IF)	Dako
Polyklonaler anti-HPR-3 aus Kaninchen	1:100 (IHC)	
	Abouzied et.al., 2004	
Polyklonaler anti NeuN aus Maus	1:500 (IHC)	Chemicon
Hybridoma 12CA5 (Anti-HA Tag), aufgereinigt	10 µg/ml (WB)	Roche
Polyklonaler anti Calnexin aus Ratte	1:500 (IF)	Chemicon
Polyklonaler anti cFos aus Kaninchen	1:3000 (IHC)	Santa Cruz
Peroxidase gekoppelter anti-Maus aus Ziege	1: 5000 (WB)	Dianova
Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen aus Ziege	1:5000 (WB)	Dianova
Peroxidase gekoppelter anti-Ratte aus Ziege	1:5000 (WB)	Dianova
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen-IgG aus Ziege	1:400 (IF)	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-Ratte-IgG aus Ziege	1:400 (IF)	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 anti-Ratte-IgG aus Ziege	1:400 (IF)	Molecular Probes
Alexa Fluor 568/680 anti-Maus-IgG aus Ziege	1:400 (IF)	Molecular Probes
Alexa Fluor $F(ab')_2$ fragment 586 anti-Ratte-IgG aus Ziege	1:400 (IF)	Molecular Probes
Cy2- anti-Kaninchen-IgG aus Ziege	1:400 (IF)	Jackson Laboratories
Biotinylierter anti-Ratte aus Ziege	1:200 (IHC)	Dianova
Biotinylierter anti-Maus aus Ziege	1:200 (IHC)	Dianova

*Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa (http://dshb.biology.uiowa.edu/)

IHC= Immunhistochemie; IF= Immunfluoreszenz; WB= Western-Blot-Analyse

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Wildtyp-Kontrolltiere

Als Kontrollen wurden Tiere der Stämme C57BL/6, 129Ola und C57BL/6/129Ola verwendet. Die Tiere wurden sowohl von Charles River Deutschland (Kisslegg/Sulzfeld) bezogen, als auch aus eigener Zucht verwendet.

2.2.2 ASA-Knockout-Mäuse

Die Arylsulfatase A defiziente Mausmutante wurde von Hess 1996 (Hess et al., 1996) generiert. Die Tiere der hier beschriebenen Versuche stammen aus eigener Weiterzucht der durch Hess generierten Mauslinie. Arylsulfatase A defiziente Mäuse dienen als Modell für eine besondere Form der Lipidose, der Metachromatische Leukodystrophie.

2.2.3 ApoE-Knockout-Mäuse

Die ApoE-Knockout-Mäuse wurde von A.S. Plump (Plump & Breslow, 1995) hergestellt. Sie wurden von der Firma Charles River bezogen. Zur Erhaltung der Mauslinie wurden ausschließlich die homozygoten Mäuse verpaart.

2.2.4 ASA-Knockout/ApoE-Knockout-Mäuse

Die ASA-Knockout/ApoE-Knockout-Mäuse wurden durch die Verpaarung von homozygoten ASA- und ApoE–Knockout-Mäusen hervorgebracht.

2.2.5 Thy1-CGT transgene Mäuse

Diese Mausmutante wurde von Dr. M. Eckhardt (Eckhardt et al., 2007) generiert.
Die CGT-Sequenz aus Ratte unter der Kontrolle des neuronalen Thy1-Promotors wurde in das Mausgenom eingefügt. Daraus resultierten zwei verschiedene transgene Mauslinien, die je nach Integrationshäufigkeit des Thy1-CGT-Transgens eine unterschiedlich starke Expression des Transgens aufwiesen. Beide Mauslinien, Linie 4747 und Linie 4743 mit einer transgenen Expression wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Zur Erhaltung der Mauslinie wurden für die Verpaarungen Wildtyp-Mäuse verwendet.

2.3 Anfertigung von Gewebeschnitten

Um verschiedene Untersuchungen wie Anfärbungen von Proteinen und histologische Untersuchungen durchführen zu können, wurden von Mausgehirn-Gewebe mittels eines Mikrotoms wie auch eines Kryostaten Schnitte angefertigt.

2.3.1 Paraffinschnitte

Das Mausgehirn wurde im Vorfeld mit 4% PFA perfundiert und über Nacht wieder in 4 % PFA fixiert. Danach wurde das Gewebe in PBS gewaschen und mit Hilfe der Paraffiniermaschine von Sakura in einem Vakuum-Infiltrations-Prozessor über eine Alkoholreihe entwässert und anschließend in flüssigem Paraffin eingebettet. Die fertiges Gewebe beinhaltenden Paraffinblöcke wurden zum Anfertigen der 4 µm dicken Schnitte vorgekühlt. Die jeweiligen Gewebeschnitte wurden mit dem Mikrotom von Leica angefertigt. Die gewonnenen Schnitte wurden getrocknet und bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.2 Gefrierschnitte

Das Gewebe wurde nach der Präparation über Nacht in 4% PFA fixiert und eine weitere Nacht mit 20% Saccharose inkubiert. Dies diente dazu, die Bildung von Gefrierkristallen, die das Gewebe zerstören könnten, zu verhindern. Danach wurde das Gewebe bei -80°C eingefroren. Das Gewebe wurde dann im Kryostaten bei -20°C durch das Einbetten in spezielles Gefriermedium (Sakura, Tissue-Tek O.C.T™ Compound) auf der Schneidehalterung fixiert und bei einer Temperaturen zwischen -15°C und -20°C geschnitten. Die Schnittdicke lag zwischen 12-14 µm. Die auf Objektträger aufgenommenen Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4 Mikrobiologische und Molekularbiologische Methoden

2.4.1 *In vitro* Transfektion von Zellen

2.4.1.1 Kultivierung von Zellen

Sämtliche Arbeiten mit Säugerzellen fanden unter sterilen Bedingungen statt und es wurden ausschließlich sterile Einmalplastikmaterialien verwendet. Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden stets vor Gebrauch auf 37°C aufgewärmt.
Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen, die eine Größe von 80 cm^2 bzw. 175 cm^2 hatten, in DMEM-Medium bei 37°C in einem wasserdampfgesättigten Inkubationsschrank mit einem 5%-igen CO_2-Anteil kultiviert. Das verwendete Grundmedium DMEM enthielt anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, Glukose, Puffer und den Indikatorpuffer Phenolrot. Des Weiteren wurden für das optimale Zellwachstum fötales Kälberserum (FCS, 10% Endkonzentration) und Penicillin (1 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) eingesetzt.
FCS enthält Wachstumsfaktoren, Hormone und Proteine wie Albumin. Es wurde hitzeinaktiviertes (56°C für 30 Minuten) FCS verwendet, um im Serum enthaltene Komplementfaktoren zu inaktivieren und eine Komplementaktivierung und Zelllyse zu vermeiden. Die Antibiotika dienten als vorbeugende Maßnahme zur Vermeidung von Kontaminationen durch Bakterien.
Die Zellen wurden alle fünf Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Hierzu wurden Zellen mit 10 ml Trypsin durch vorsichtiges Spülen mit einer Pipette von dem Kulturschalenboden abgelöst, in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und mit DMEM-Medium gewaschen und zentrifugiert (5 Minuten, 300 x *g*). Das Pellet wurde in 10 ml DMEM-Medium resuspendiert und die Zelllösung in neue Kulturflaschen überführt.

2.4.1.2 Einfrieren und Auftauen

Nachdem die Zellen mit Trypsin abgelöst und bei 1200 rpm für 5 Minuten. zentrifugiert waren, erfolgte eine Resuspension der Zellpellets in 20% FCS, 10% DMSO in DMEM. Die Zellsuspension wurde in Cryo-Röhrchen aliquotiert (je 1 ml), für zwei Tage bei –80°C gekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.
Zum Auftauen wurden die Zellen auf 37°C erwärmt und in 10 ml vorgewärmtem DMEM-Medium resuspendiert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml DMEM aufgenommen

und 1 ml der Zellsuspension wurde in 6 ml DMEM in einer 25 cm^2 Zellkulturflasche kultiviert.

2.4.1.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl wurde mit einem Hämozytometer nach Neubauer bestimmt. Das Raster der Zählkammer ist in neun Quadrate unterteilt, wobei sich in den vier Ecken Flächen zum Auszählen befinden. Diese vier Eckquadrate sind wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilt und haben je eine Fläche von 1 mm^2.
Vor der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen wie bei der Kultivierung, abgelöst und abzentrifugiert und anschließend in frischem DMEM-Medium aufgenommen.
Um die Vitalität der Zellen zu bestimmen, wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt und auf die Zellkammer aufgebracht. Abgestorbene Zellen haben eine veränderte Membrandurchlässigkeit, dadurch dringt das Trypanblau in die Zellen ein, während gesunde Zellen ungefärbt bleiben.
Pro Ansatz wurden mindestens 100 Zellen gezählt, je nach Zellzahl wurden bis zu vier Eckquadrate gezählt. Die Zellzahl / ml wurde wie folgt berechnet:

Formel: $(N_{Zellen} / N_{Quadrate}) \times 2 \text{ (Verdünnung)} \times 10^4 = \text{Zellen / ml}$

2.4.1.4 Transfektion von Zellen

Die Transfektion dient der Einschleusung heterologer DNA in Eukaryontenzellen. Die verwendeten Methoden wurden zur transienten Transfektion eingesetzt. Transiente Transfektion bedeutet kurzfristiges Einbringen von DNA in viele Zellen. Dadurch ist eine schnelle funktionelle Untersuchung innerhalb von ein bis drei Tagen möglich.
Zur Transfektion von Zellen wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Ansätze verwendet.

a) ExGen-Methode (nach Fermentas)

Das Makromolekül-Reagenz Polyethylenimin (PEI), das eine kationische Ladungsdichte besitzt, reagiert mit der DNA zu einem starken diffusionsfähigen Komplex, der leicht über Endozytose in die Zelle aufgenommen wird.

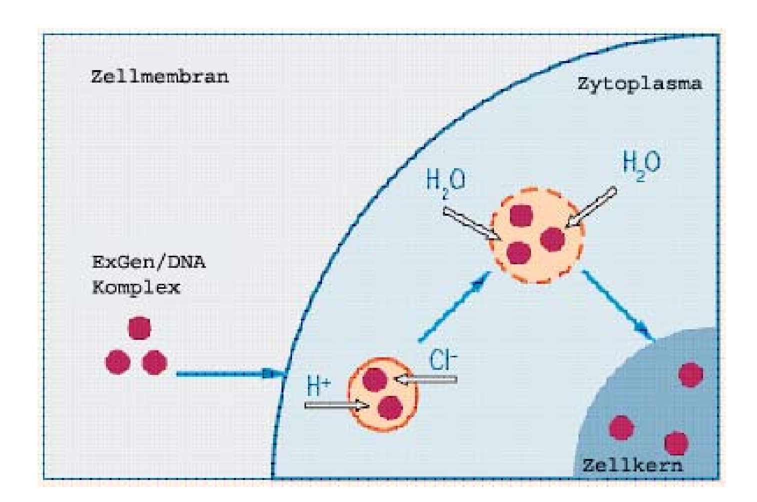


Abb. 2.1: Der Polyethylenimin-DNA-Komplex wird über Endozytose in die Zelle aufgenommen (modifiziert nach Fermentas).

Vorbereitung der Zellen:

Eine 24-Loch-Zellkultur-Platte wurde mit sterilen Deckgläschen (ø 12 mm) bestückt. In jeder Vertiefung der Zellkultur-Platte wurden $5x10^4$ Zellen ausgesät und über Nacht im CO_2-Brutschrank unter Standardkulturbedingungen inkubiert.
Am Tag der Transfektion wurde das Kulturmedium zwei bis vier Stunden vor der Versuchsbeginn/Transfektionsbeginn erneuert. NaCl-Lösung und PBS wurden auf Raumtemperatur erwärmt.

Herstellung eines Endozytose-Komplexes

Um eukaryontische Zellen mit DNA transfizieren zu können, muss die DNA zunächst mit ExGen zu einem diffusionsfähigen Komplex verbunden werden.
Zur Herstellung des Komplexes wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert (Beispiel für einen Ansatz):

DNA	2 µg	ExGen	3,3 µl
150 mM NaCl	25 µl	150 mM NaCl	25 µl

Die ExGen Lösung wurde zu der DNA Lösung hinzugefügt, gut gemischt und für 10 Minuten. bei RT inkubiert.

Transfektion:

Von den vorbereiteten Zellen wurde das Medium abgenommen und je 300 µl serumfreies Medium zu den Zellen gegeben. 50 µl der ExGen-DNA Lösung wurde tropfenweise hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 4-5 Stunden und Standardkulturbedingungen, dann wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erhielten die Zellen 0,5 ml serumhaltiges DMEM und wurden über Nacht wieder in den CO_2-Brutschrank gestellt.

b) Lipofectamin–Methode (nach Invitrogen)

Bei der Lipofectamin-Methode erfolgt die Einschleusung der DNA in die Zelle durch Liposomen. Der Vorteil bei dieser Technik ist, dass nur eine geringe Menge an DNA und wenige Zellen für die Transfektion notwendig sind.

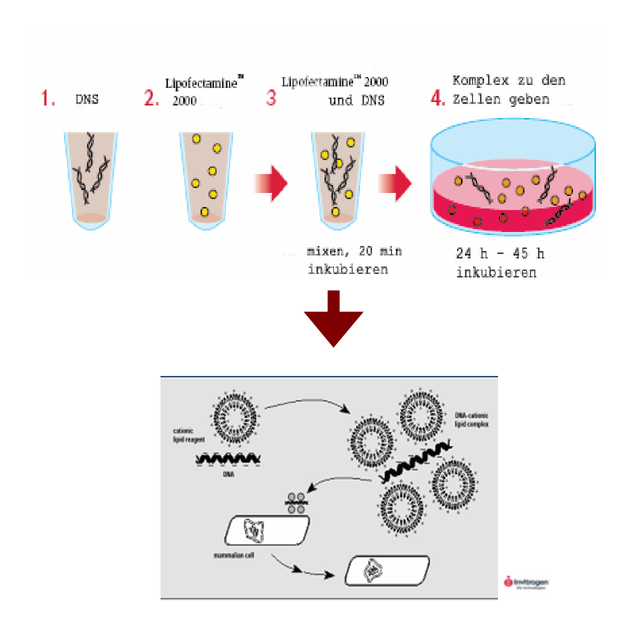


Abb. 2.2: Lipofectamin-Methode. Kationische Lipide verbinden sich mit der DNA und werden zusammen von der Zelle aufgenommen (modifiziert nach Invitrogen).

Vorbereitung der Zellen:

Eine 24-Loch-Zellkultur-Platte wurde mit sterilen Deckgläschen (ø 12 mm) bestückt. In jede Vertiefung wurden $3x10^4$ Zellen ausgesät und über Nacht im CO_2-Brutschrank inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde das Kulturmedium erneuert.

Herstellung des DNA- Liposomen-Komplexes:

Zur Herstellung des DNA-Liposomen-Komplexes wurde folgender Ansatz pipettiert:

DNA	5 µg	Lipofectamin	2 µl
DMEM (ohne FCS und Antibiotikum)	50 µl	DMEM (ohne FCS und Antibiotikum)	50 µl

Die DNA- und die Lipofectamin-Lösung wurden zusammengegeben, vorsichtig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Transfektion:

Zu den Zellen wurde 100 µl des DNA-Liposomen-Komplexes tropfenweise hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über 4-5 Stunden bei 37°C im CO_2-Brutschrank.
Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, erhielten 0,5 ml DMEM und wurden anschließend über Nacht wieder im CO_2-Brutschrank kultiviert.

2.4.1.5 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion erfolgt ein Einbau der DNA in das Genom, das auch an die nächste Generation weitergegeben wird.
Die Herstellung einer stabilen Zelllinie erfolgte zunächst wie bei einer transienten Transfektion. Allerdings wurden die Zellen nach 48h in eine 6mm- Zellkultur-Platte überführt und unter Selektionsdruck gesetzt. Dieser erfolgte mittels Zugabe eines Antibiotikums, gegen das die eingeschleuste Fremd-DNA-Plasmid eine Resistenz besitzt. Diejenigen Zellen, die die DNA eingebaut hatten, überlebten. Die Antibiotika-Zugabe wurde so lange durchgeführt, bis stabile Zellklone sichtbar wurden. Diese Klone wurden wiederum umgesetzt und auf Expression der eingebauten Fremd-DNA untersucht.

2.4.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Mit Hilfe von Antikörpern lassen sich Proteine und andere Substanzen innerhalb von Zellen detektieren. Antikörper binden an Antigene. Durch gründliches Waschen werden unspezifische Bindungen gelöst, um die spezifischen Oberflächenmerkmale von Proteinen,

die von den Antikörpern erkannt werden, zu erhalten, müssen die ausgewählten Bereiche vorsichtig fixiert werden.
Die Sichtbarmachung von Antigen-Antikörper-Reaktionen kann durch verschiedene Methoden erfolgen. Sie kann auf einer stabilen Brücke zwischen dem gesuchten Reaktionspartner (Antikörper/Antigen) mit dem Amplifikationssystem beruhen. Als Amplifikatoren dienen in dieser Arbeit Fluoreszenzfarbstoffe. Die Amplifikatoren werden kovalent oder nicht kovalent (adsorptiv) an die Reaktanten gekoppelt.
Bei der indirekten Immunfluoreszenz-Methode erfolgt die Markierung des Primärantikörpers durch den Einsatz von fluoreszierenden Antiimmunglobulinen durch einen Sekundärantikörper, der von einer anderen Tierspezies stammt und prinzipiell alle Primärantikörper bindet, gegen die er gerichtet ist.
Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe werden durch unterschiedliches Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, beispielsweise blau, UV oder grün. Mittels verschiedener Filter ist nur das Licht der verwendeten Farbstoffe oder Fluorochrome im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen, so dass der indirekte Nachweis von bestimmten Proteinen möglich ist. Durch die Verwendung von mehreren Primärantikörpern gegen verschiedene Proteine und deren indirekten Nachweis mit geeigneten Sekundärantikörpern, die mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelt sind, lassen sich außerdem Kolokalisationen innerhalb einer Zelle ermitteln.

2.4.2.1 Immunfärbung

In den Versuchen wurde die indirekte Immunfluoreszenz- Methode angewandt:
Die Zellen wurden auf den Deckgläschen durch 4%-iges PFA für 15 Minuten fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden Zellen anschließend für 10 Minuten mit 0,3% Triton X-100/PBS (perforiert die Membran) behandelt. Das im Puffer enthaltene Triton X-100. Bei Immunfärbungen gegen Sulfatid wurden die Zellen nicht permeabilisiert, da das im Puffer enthaltene Triton X-100 das Sulfatid aus der Membran herauslöst.
Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Zellen 30 Minuten lang in Blocking-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verringern. Es handelte sich hier um eine Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen durch 0,3% Gelatine.
Die Immunfärbung wurde in einer feuchten Kammer (Petrischale ausgelegt mit wassergetränktem Filterpapier) auf Parafilm durchgeführt. Nach 1-2h Inkubation mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS

gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach dem Waschen wurde der Sekundärantikörper ebenfalls für 60 Minuten im Dunkeln eingesetzt. Eine erneute Waschung mit PBS entfernte unspezifische Bindungen. Hiernach erfolgte eine Färbung des Zellkerns mit dem DNA-Farbstoff DAPI (4´,6-Diamidin-2´-phenyllindol-dihydrochlorid) für 5 Minuten..
Nach dem Färben wurden die Deckgläschen auf Objektträgern in Polyvinylalkohol (Fluka) eingebettet und bis zur Auswertung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.4.2.2 Mikroskopische Auswertung der Immunfärbungen

Die Präparate wurden mit den Fluoreszenzmikroskopen Axioplan und Aixoimages (Zeiss) mit Fluoreszenzfiltern für TexasRed, RFP, FITC und DAPI untersucht. Die Mikroskope waren mit einer AxioVision-Software ausgestattet. Die elektronischen Bilder wurden zur Publikation mit ADOBE PHOTOSHOP 7.0 bearbeitet.

2.5 Nucleinsäure Präparationen

2.5.1. Kultivierung der Bakterien

Für die Kultivierung von Bakterien wurde der zu untersuchende Stamm mittels einer sterilen Impföse einem DMSO-Stock entnommen und auf einer LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Nach etwa 12 Stunden Inkubation, bei 37°C, wurden die Bakterien entweder in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten bei 37°C weiter kultiviert.
Für die Kultivierung resistenter Bakterienstämme wurden die entsprechenden Antibiotika den Nährmedien zugesetzt.
Übernacht-Kulturen wurden in 5 ml LB-Medium (inklusive Antibiotikum) angelegt. Für die anschließende Tag-Kultur wurde die Übernacht-Kultur 1:200 in frischem LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 rpm im Brutschrank bis zum Erreichen der mittleren log-Phase (OD_{600} = 0,3) inkubiert.

2.5.2 Lagerung von Bakterien

Für die längere Aufbewahrung von Bakterienstämmen bei –80°C wurden 7 % DMSO-Stocks angelegt. DMSO verhindert die zellschädigende Kristall-Bindung des Wassers.

2.5.3 Amplifizierung und Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Transfektionen wurde reine Plasmid-DNA benötigt. Hierzu wurden die entsprechenden Plasmide in *E.coli*-Stämme transformiert, mit Mini-Prep (Qiagen) aufgereinigt, über Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und schließlich mittels Maxi-Prep (Qiagen) in großer Menge isoliert.

2.5.3.1 Transformation von *E.coli*-Zellen

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz wurden 50 µl Bakterien mit 1 µg/µl Plasmid-DNA vorsichtig vermischt. Als Kontrolle diente ein Aliquot Bakterien ohne Zugabe von DNA. Die Ansätze wurden 30 Minuten auf Eis gehalten, anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Dann wurden die Bakterien für weitere 1,5 Minuten abgekühlt (auf Eis). Danach wurden direkt 950 µl SOC-Medium zugegeben und die *E.coli*-Zellen für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien bei 4000 x *g* für 10 Minuten und 4°C abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 850 µl verworfen, mit dem Rest wurde das Pellet resuspendiert. Je 1x10 µl und je 1x100 µl pro Ansatz wurden auf Ampicillin-Platten (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.5.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Präparation erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse. Die Lyse der Zellen erfolgt hierbei durch SDS; das alkalische Milieu denaturiert DNA und EDTA inhibiert DNasen durch das Entziehen von Mg^{2+}-Ionen. Um zu verhindern, dass freie RNA bei der Affinitätschromatographie mit der Plasmid-DNA um die Bindungsstelle konkurriert, wurde dem Puffer außerdem RNase A zugegeben, um die freigesetzte RNA zu hydrolysieren. Nach der Lyse und der darauf folgenden Abtrennung der denaturierten, nicht-löslichen Zellbestandteile wurde der Überstand auf Silicagelsäulen aufgetragen. Silica ist in der Lage

bei hohen Salzkonzentrationen Plasmid-DNA zu binden. Die gebundene Plasmid-DNA kann dadurch sehr einfach gewaschen und anschließend mittels niedriger Salzkonzentration wieder von der Säule eluiert werden.

2.5.3.3 Plasmid-Isolierung (analytischer Maßstab, »Mini-Prep«)

Von selektiven LB-Platten wurden Einzelkolonien gepickt, in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert.
Für die darauf folgende Isolierung der Plasmid-DNA wurde das QIAprep-Spin Mini-Prep-Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung der Isolierung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die isolierte DNA wurde anschließend über einen Restriktionsverdau getestet.

2.5.3.4 Plasmid-Isolierungen (präparativer Maßstab, »Midi-Prep«)

Zur Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAprep Plasmid Midi-Prep-Kit (Qiagen) eingesetzt. Die Säulen-Kapazität der zu isolierenden DNA liegt bei ca. 500 µg DNA. Dazu wurde die Übernacht-Kultur einer vorher untersuchten Mini-Prep (vgl. 2.5.3.3 sowie 2.5.3.5) 1:100 in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) angeimpft und über Nacht im 37°C-Schüttler inkubiert.
Die Isolierung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und die isolierte Plasmid-DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.3.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basenabfolgen von vier, sechs oder acht Basen, die in den meisten Fällen palindromisch sind. Die Enden des DNA-Fragments sind entweder glatt (sog. „*blunt ends*“) oder sie stehen über (sog. „*sticky ends*“). Die Überhänge der *sticky ends* sind oft zwei bis vier Basen lang und lassen sich leichter in Vektoren ligieren als glatte Enden. Die hier verwendeten Restriktionsenzyme wurden für analytische und präparative Arbeiten eingesetzt.

Um zu kontrollieren, ob das gewünschte Plasmid isoliert wurde, erfolgte ein Restriktionsverdau mit der eluierten DNA einer Mini-Prep (siehe 2.5.3.3), der zur abschließenden Analyse auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen wurde.
Die Methode wurde nach Sambrock et al (1989) durchgeführt.
In einem Endvolumen von 25 µl wurden folgende Reaktionen gestartet:

5x Puffer	5 µl
Restriktionsenzym	1 µl
DNA-Lösung	1 µg/µl
ad H_2O	25 µl

Als Puffer wurden die von jedem Hersteller zu den jeweiligen Enzymen empfohlenen Puffer verwendet. Der Reaktionsansatz wurde je nach Enzym und Angabe des Herstellers für 1-2,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung, d.h. der abschließenden Analyse durch Agarosegel Auftrennung der Restriktionsfragmente, wurde der Ansatz auf Eis gehalten, um weitere Reaktionen der Restriktionsenyme zu verhindern.

2.5.3.6 Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich in Agarose-Gelen mittels Elektrophorese auftrennen. Durch Vergleich der Laufstrecke mit gleichzeitig aufgetrennten Größenstandards lässt sich die Größe der einzelnen Fragmente abschätzen. Für diese Arbeit wurde eine Agarosekonzentration von 1% (w/v) eingesetzt. Die jeweilige Menge Agarose wurde in 100 ml 1 x TAE-Puffer gelöst und im Mikrowellengerät geschmolzen. Nach dem Abkühlen wurde die Agarose mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 2 µl Loading-Puffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V. Das Ergebnis wurde durch Betrachtung bei UV-Licht kontrolliert und als Videoprint dokumentiert.

2.5.3.7 Konzentrationsbestimmungen von DNA

Die Konzentration der DNA lässt sich anhand der optischen Dichte bestimmen. DNA hat im ultravioletten Bereich der elektromagnetischen Strahlung sein Absorptionsmaximum bei

260 nm. Ein Absorptionsmaximum von 280 nm haben die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin.
Für doppelsträngige DNA entspricht eine optische Dichte (OD) von eins bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml. Die Konzentration lässt sich aus der OD bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA spezifischen Extinktionskoeffizienten errechnen.
Der Reinheitsgrad der DNA wurde aus dem Verhältnis zwischen OD_{260} und OD_{280} bestimmt, wobei eine relativ proteinfreie DNA-Lösung ein Verhältnis zwischen 1.8 und 2.0 aufweist.

2.5.3.8 Reverse Transkription

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung sieht ungefähr folgendermaßen aus: Die Zellen werden lysiert, die RNasen inaktiviert und die RNA anschließend aus dem Lysat isoliert. Auf diese Weise erhält man am Ende Gesamt-RNA, d.h. ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA), *messenger* RNA (mRNA) und anderen. Die mRNA macht daran nur einen Anteil von ca. 2 % aus. Für die meisten Anwendungen reicht das bereits aus, beispielsweise für RT-PCR.

Reverse Transkriptasen katalysieren die Bildung eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) aus mRNA. Für die cDNA Synthese aus isolierter mRNA wurde das RT-PCR-KIT (First Strang) der Firma Fermentas verwendet. Es wurde ein Oligo dT Primer verwendet, der an die 3‘ PolyA-Sequenz der RNA binden kann.
Für eine Reverse Transkription wurde entsprechend den Angaben des Herstellers folgender Reaktionsansatz verwendet:

4 µl	5x First-Strang Puffer
1 µl	10 mM dNTP
1 µl	0,5 µg/µl Primer
1 µl	20 U/µl RNase Inhibitor (RiboLockTM)
1 µl	200 U/µl RT (RevertAid^{TM}) H Minus
X µl	1-5 µg RNA
ad 10 µl	HPLC-H_2O

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 70°C und dann für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Inkubation für 1 h bei 42°C durchgeführt. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgt bei 95°C für 10 Minuten. Danach wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.
In der darauf folgenden PCR, die dazu diente spezifische Nukleinsäureabschnitte zu amplifizieren, wurden 0,5 µl bzw. 2 µl des cDNA- Reaktionsansatzes eingesetzt.

2.5.3.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt eine leistungsfähige Technik zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten dar.
Über spezifische Oligonukleotid-Primer, so genannte Startermoleküle, welche das zu amplifizierende Fragment flankieren, können mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase DNA-Fragmente von bis zu 15 kb amplifiziert werden.
In dieser Arbeit wurden für die PCR das System von Fermentas und das RedTaq Ready Mix Kit® von Sigma verwendet. Die Reaktionsansätze setzten sich für die beiden Systeme wie folgt zusammen:

Fermentas		Sigma	
2 µl	10x Taq Reaction-Puffer	10 µl	Red Taq Ready Mix
2 µl	2 mM dNTPs	2 µl	Primer 1 (5 pmol/µl)
1,2 µl	$MgCl_2$	2 µl	Primer 2 (5 pmol/µl)
1 µl	Primer 1 (5 pmol/µl)	x µl	Template
1 µl	Primer 2 (5 pmol/µl)	ad 20 µl	PCR-H_2O
1 µl	Taq-Polymerase		
X µl	Template		
ad 20 µl	HPLC-H_2O		

Die PCR-Reaktion besteht aus drei grundlegenden Schritten.
Zu Beginn eines Zyklus wird die doppelsträngige DNA in der Denaturierungsphase in Einzelstränge aufgetrennt. Danach erfolgt die Anlagerung der Primer an die DNA.

Die Temperatur für die Primer-Anlagerung hängt von deren Schmelztemperatur und damit von der Länge und Basenzusammensetzung der jeweiligen Primer ab. Die Schmelztemperatur (T_m) wird über folgende Formel abgeschätzt werden:

T_m = [2°C x (Anzahl an A und T Basen)] + [4°C x (Anzahl an G und C Basen)]

Die Temperatur für die Primeranlagerung sollte ~5-10°C unter der Schmelztemperatur liegen. Zuletzt folgt die Verlängerungsphase, in der die Polymerase aktiv wird und die eigentliche Amplifizierung der DNA stattfindet.
Ein Zyklus aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung wurde in der Regel 25-35 Mal durchgeführt. Dauer und spezifische Temperaturen der einzelnen Schritte wurden je nach Anwendung modifiziert, um optimale Bedingungen für die Primer zu schaffen und optimale DNA Ausbeuten zu erreichen.

Reaktionsbeispiel

5	min.	95°C Initiale Denaturierung
30	Sek.	95°C Denaturierung
30	Sek.	55°C Primer-Anlagerung
1	min./kb	72°C Primer-Verlängerung
5	min.	72°C
∞		4°C

2.5.3.10 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Gewinnung reiner DNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, bei der linearisierte DNA von Nukleinsäuren, Proteinen und anderen Verunreinigungen befreit wurde. Dazu wurde die DNA-Lösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1; v/v/v) versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei verschiedenen Phasen: die untere ist die Phenolphase, in der Interphase sind Proteine enthalten, und die obere, wässrige Phase enthält die DNA. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um Verunreinigungen durch Phenolreste auszuschließen, wurden erneut zwei Volumen Chloroform zugefügt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die obere Phase (gelöste Nukleinsäuren) wurde abgenommen, die Nukleinsäuren anschließend

präzipitiert (vgl. folgender Abschnitt) und je nach Bedarf weiter verarbeitet oder gelagert (bei -20°C).

2.5.3.11 Saure Ethanolfällung

Bei der sauren Ethanolfällung wurde 1/10 Volumen Natriumacetat pH 4,6 und das 2,5 fache Volumen 95%-iger Ethanol zur gelösten DNA gegeben und das Reaktiongefäß mehrmals invertiert. Das Gemisch wird für 30 Minuten bei -80°C inkubiert. Danach wurde die DNA für 30 Minuten bei 15.000 g pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes kann das DNA-Pellet in 70%-igem Ethanol gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation und Abnhame des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und die DNA im gewünschten Volumen Wasser aufgenommen.

2.5.3.12 Auffüllen überhängender Vektorenden

Die durch einen Restriktionsendonuklease-Verdau entstandenen DNA-Überhänge können mit Hilfe des Klenow Fragmentes aufgefüllt werden. Das Klenow Fragment ist eine Typ I DNA-Polymerase, die neben der 5'-3' Polymeraseaktivität auch eine 3'-5' Fehlerkorrektur-Exonukleaseaktivität aufweist, aber keine DNA-Polymerase I Exonukleaseaktivität. In dieser Arbeit wurde das Klenow Enzym von Fermentas nach folgendem Ansatz verwendet:

0,1-0,4	µg	verdaute DNA
2,0	µl	10x Klenow Puffer
0,5	µl	2mM dNTP Mix
0,5	µl	Klenow Fragment (10 U/µl)
ad 20	µl	HPLC-H_2O

Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Klenow Fragments erfolgte durch eine Inkubation bei 70°C für 15 Minuten.

2.5.3.13 Ligation

Die Einbringung eines DNA-Fragmentes (Insert) in einen linearisierten Vektor, ebenso wie die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente kann mittels des Enzyms T4-Ligase erreicht werden. Der Vorgang an sich wird als Ligation bezeichnet. Die T4-Ligase katalysiert hierbei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphat-Ende des DNA-Fragmentes und der 3'-OH-Gruppe eines anderen DNA-Fragmentes bzw. des Vektors. Die Bildung von Phosphodiesterbindungen erfolgt unter Hydrolyse von ATP und kann sowohl bei überhängenden Enden als auch bei nicht-überhängenden Enden erfolgen.

In dieser Arbeit wurde für die Ligation von DNA-Fragmenten die T4 DNA Ligase von Fermentas verwendet. Ligationen wurden in kleinen Volumina durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass sich die kompatiblen Enden zusammenlagern.

Folgende Ansätze wurden verwendet:

Glatte Enden	Überhängende Enden	
2 µl	2 µl	T4 DNA Ligase Puffer
1 µl	0,5 µl	T4 DNA Ligase (1 Weiss Unit/µl)
20 ng	20 ng	Vektor
1-3 fache Menge des Vektors	1-3 fache Menge des Vektors	Insert
ad 20 µl	ad 20 µl	HPLC-H_2O

Der Ansatz wurde durch kurzes Zentrifugieren gemischt und für 1 h bei RT (22°C) inkubiert.

Die Berechnung von Vektor- und Insertmenge, die für eine optimale Ligation benötigt werden, wurde durch die nachstehende Formel berechnet:

$$\text{X ng Insert} = \frac{(\text{Y bp Insert}) \cdot (\text{Z ng Vektor})}{(\text{total bp Vektor})}$$

2.5.3.14 Herstellung von Adaptern

Für die Erstellung von sehr kleinen DNA-Fragmenten, die mittels PCR-Amplifikation nicht möglich wären, wurden Oligonukleotid-Adapter erzeugt. Kurze Adapter können durch das Aneinanderlagern von Oligonukleotidstartermolekülen hergestellt werden. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

10	µg	Oligonukleotid I
10	µg	Oligonukleotid II
10	µl	T4-Ligase
70	µl	HPLC-H_2O

Der Ansatz wurde 2 Minuten bei 95 °C inkubiert, dann innerhalb von 2 Minuten schrittweise auf 50 °C abgekühlt und für 8 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend folgte die Abkühlung auf Raumtemperatur und eine Inkubation für 10 Minuten.
Der Adapter wurde nun mittels der sauren Ethanolfällung (vgl. XXX Abschnitt oben) gefällt und das Pellet schließlich in 15 µl Wasser aufgenommen.
Verwendet man zwei Oligonukleotidmoleküle, die an ihren Enden komplementär zueinander sind, können auch längere Adapter hergestellt werden.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 *In-situ*-Hybridisierung

2.6.1.1 Herstellung der RNA-Gensonden

Zur Herstellung einer Sonde wurde das zur Hybridisierung einzusetzende Fragment in einen geeigneten Transkriptionsvektor, der T3-, T7- oder SP6-Promotoren enthält, umkloniert. Zur Markierung wurden 1-2 µg Plasmid linearisiert, anschließend unter RNase-freien Bedingungen durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und der sauren Ethanolfällung unterzogen. Die Markierung erfolgte mittels eines DIG-Labeling Kits der Firma Roche.
Dazu wurde in DEPC-behandeltem H_2O gelöste DNA mit 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 2 µl DIG-Labeling-Mix und 2 µl der entsprechenden RNA-Polymerase versetzt und 2 h bei 37°C

inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Entfernung der DNA durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase I (10 U/µl) bei 37°C für 15 Minuten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA gestoppt, und die synthetisierte RNA wurde erneut mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Die Sonde, die sich im Pellet befindet, wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, die RNA getrocknet und das Pellet schließlich in DEPC-behandeltem H_2O aufgenommen.
Um die Markierungseffizienz zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe der markierten Probe und einer markierten Kontroll-RNA angefertigt. Je 1 µl der Verdünnungen wurde auf einer Nylonmembran (Hybond N+) fixiert und bei einer Temperatur von 120°C für 30 Minuten gebacken. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit dem anti-DIG-F_{ab}-AP-Konjugat wie unten (2.6.1.2) beschrieben. Als Reagenz zur Chemilumineszenz-Reaktion wurde die NBT/BCIP-Lösung (Roche; 200 µl auf 10 ml AP-Puffer) verwendet. In den verschiedenen Versuchen wurden die ihrer Markierungseffizienz der Sonden entsprechenden Verdünnungen eingesetzt. Die Sonden Antisense-CGT und Sense-CGT wurden 1:1000 eingesetzt.

2.6.1.2 *In-situ*-Hybridisierung

In-situ-Hybridisierung dient zum Nachweis von RNA oder DNA in Geweben bzw. Zellen mittels einer hergestellten Sonde aus einer Nukleinsäure, die über Basenpaarung an die nachzuweisende Nukleinsäure hybridisiert.
Für diese Analyse dienen als Ausgangsmaterial Gefrier- / Parafinschnitte von Mäusegehirnen, die wie unter 2.3 beschrieben hergestellt wurden.
Wenn Paraffinschnitte genutzt wurden, mussten diese zunächst von dem Paraffin befreit werden, Gefrierschnitte konnten direkt fixiert werden (s.u.). Die Schnitte wurden zunächst in drei Xylolbäder für 10 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine „Wässerung“ der Schnitte, da das Gewebe für die Anfertigung von Schnitten entwässert worden war. Die Zuführung von Wasser erfolgt über eine absteigende Propanolreihe (100%, 100%, 100%, 96%, 90%, 75%, 50%) in der die Schnitte jeweils für 5 Minuten inkubiert wurden. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten mit PBS gewaschen und in 4% PFA für 90 Minuten fixiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und für 4 Minuten in Proteinase K (10 µg/ml) inkubiert, erneut mit PBS gewaschen und für weitere 4 Minuten mit 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Die Schnitte wurden für weitere dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen und

anschließend für 8 Minuten in 0,2 M HCl und danach für 10 Minuten in 0,1 M TEA-Lösung inkubiert.
In der Zwischenzeit wurden die Sonde in Hybridisierungspuffer mit 0,08 M DTT entsprechend ihrer Markierungssignalstärke verdünnt, für 5 Minuten bei 80°C inkubiert und bis zur Verwendung auf Eis bewahrt.
Nach der Inkubation mit TEA-Lösung wurden die Schnitte für weitere 10 Minuten bei 50°C in 2 x SSC inkubiert und danach direkt auf die Schnitte gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70°C in einer feuchten Kammer. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten mit 2 x SSC bei 60°C gewaschen, dann einmal für 30 Minuten mit 0,1 x SSC / 50% Formamid inkubiert und abschließend für 45 Minuten in 0,1 x SSC gewaschen. Als nächstes erfolgte die Äquilibrierung der Schnitte in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5), bevor unspezifische Bindungsstellen für 30 Minuten mit Blocklösung (2% Blockreagenz von Boehringer-Mannheim in Maleinsäurepuffer) geblockt wurden. Der anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment Antikörper wurde 1:5000 in der Blocklösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Schnitten inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurden die Schnitte 5 x je 1 h mit Maleinsäurepuffer gewaschen und anschließend mit AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) äquillibriert. Für die Entwicklung wurde die NBT/BCIP-Lösung in dem AP-Puffer entsprechend den Herstellerangaben verdünnt und für 2 h bis drei Tage in einer feuchten Kammer auf die Schnitte gegeben.

2.6.2 Nachweis von Proteinen

2.6.2.1 Ernten von Zellen für die Western-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der exprimierten Proteine 48h nach Transfektion wurde das Medium von den Zellen gesammelt und die transfizierten Zellen wurden gemäß folgenden Angaben lysiert. Die Zellen wurden mit PBS dreimal gewaschen. Das vorsichtige Ablösen der Zellen wurde mit PBS / 2 mM EDTA erreicht und die abgelösten Zellen für 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 µl Lysispuffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) resuspendiert und mittels einer 23 G Kanüle 20-mal auf und ab gezogen. Dies diente zum vollständigen Aufschließen der Zellen. Hiernach wurde das Zellhomogenat für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Alle 5 Minuten wurden die Zellen stark gemischt. Danach erfolgte ein Zentrifugation des Homogenates bei 15000g für 15

Minuten bei 4°C zur Abtrennung der Zelltrümmer. Die löslichen Proteine befanden sich im Überstand und wurden zur weiteren Untersuchung nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.6.2.2 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des BioRad DC Assay Systems durchgeführt nach Lowry et al., 1951. Alle Arbeitsschritte richteten sich nach den Angaben des Herstellers (BioRad).
Zur Erstellung einer Eichkurve wurden verschiedene Konzentrationen einer BSA-Lösung folgender Konzentrationen als Standard verwendet: 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2,5 mg/ml. Je 5 µl des Standards oder der Proben wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert. Alle Werte wurden als Doppelwerte bestimmt.
Da die Puffer, in denen die Proteine gelöst waren, SDS enthielten, wurde gemäß Herstellerangaben Reagenz S zu Lösung A gegeben (20 µl Reagenz S pro 1 ml Lösung A). Von der somit hergestellten Lösung A' wurden 25 µl in jede vorgesehene Proben-Vertiefung gefüllt und mit je 200 µl Lösung B gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei RT wurde die Extinktion in einem Microplate Reader (Tecan) bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm gemessen.

2.6.2.3 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse, unabhängig von ihrer Eigenladung, erfolgt durch diskontinuierliche SDS-PAGE. Dazu werden denaturierende, SDS-haltige Gele nach Laemmli (Laemmli et al., 1970) angefertigt, die ein niederprozentiges Sammelgel und ein höherprozentiges Trenngel enthalten. In dieser Arbeit wurden zwei vertikale Elektrophoresesysteme der Firma Biorad verwendet, Mini-Protean 3 Elektrophorese System (Mini-Gele) und Protean II XL Vertikal Elektrophorese (Maxi-Gele).
Hauptbestandteil der SDS-Polyacrylamid Gele sind das anionische Detergens SDS, das die Proteine denaturiert, der Polymerisationsinitiator Ammoniumperoxodisulfat (APS), für die Quervernetzung des Polyacrylamids und der Polymerisationskatalysator TEMED. Um eine gleichmäßige Polymerisierung des Trenngels (Zusammensetzung s.u.) zu gewährleisten, erfolgte nach dem Gießen eine Überschichtung mit wassergesättigtem n-Butanol. Die

Konzentration des Trenngels wurde je nach Größe des zu untersuchenden Proteins angeglichen. Die Konzentration verringert sich, je größer die molekulare Masse des entsprechenden Proteins.

Nach dem vollständigen Polimerisieren des Trenngels wurde das n-Butanol entfernt und das Gel mit Wasser gewaschen. Das Sammelgel wurde angesetzt wie in der Tabelle angegeben und vorsichtig über das Trenngel gegossen. Mit Hilfe eines eingehängten Kamms wurden Probentaschen in das Sammelgel eingebracht.

Tabelle 2.2. Zusammensetzung der Trenngellösung (Bsp. 10 %)

	5 ml Mini-Gel [ml]	30 ml Maxi-Gel [ml]
Aqua bidest.	2,4	14,4
Acrylamid-Lsg	1,25	7,5
Trenngelpuffer	1,25	7,5
10 % SDS	0,05	0,3
10 % APS	0,05	0,3
TEMED	0,005	0,03

Tabelle 2.3. Zusammensetzung der 5 % Sammelgellösung

	2 ml Mini-Gel [ml]	8 ml Maxi-Gel [ml]
Aqua bidest.	1,2	4,8
Acrylamid-Lsg	0,25	1
Sammelgelpuffer	0,5	2
10 % SDS	0,02	0,08
10 % APS	0,02	0,08
TEMED	0,002	0,008

Nach der Polymerisierung des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer gestellt und mit den Proteinproben beladen. Als Größenstandards wurden die Proteinmarker 661 Pager Ruler und 671 Prestained Page Ruler der Firma Fermentas verwendet.

Vor dem Beladen auf das SDS-Gel wurden die Proteinproben mit 4-fach-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Proben, bei denen die Na^+/K^+-ATPase nachgewiesen werden sollte, wurden maximal auf 60°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit folgenden Spannungen bzw. Stromstärken:

Mini-Gel: 80 V bis die Probe vollständig in das Sammelgel eingewandert war, danach 120 V; Stromstärke variabel

Maxi-Gel: 25 mA je Gel mit einer Spannungsbegrenzung auf 500 V

Nachdem die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde der Strom abgeschaltet, die Gele wurden aus der Kammer genommen und wie im Folgenden beschrieben weiterbehandelt.

2.6.2.4 Semi-Dry Western-Blot (Kyse-Andersen, 1984)

Unter dem Begriff Western-Blot versteht man die Übertragung von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran, welche meist aus Nitrozellulose besteht. Die durch SDS-PAGE nach molekularer Masse aufgetrennten Proteine werden in gleicher Anordnung auf die Membran übertragen, so dass mittels Detektion bestimmter Proteine durch geeignete Antikörper die Identifizierung von spezifischen Proteinen aus einem Proteingemisch heraus möglich ist.

Das Blotten von SDS-Gelen wurde mithilfe der Semi-Dry Methode nach Kyse-Anderson durchgeführt. Für jedes Gel wurden 6 Stück Whatman-Papiere entsprechender der Gel-Größe in Blotpuffer getränkt und ein Stück Nitrozellulose-Membran in H_2O angefeuchtet. Zum Aufbau des Blots wurden drei Stück des in Blotpuffer getränkten Whatman-Papiers in einem Stapel auf die Anode gelegt, gefolgt von der angefeuchteten Nitrozellulose-Membran, dem zu blottenden Gel und den verbleibenden drei Stück Whatman-Papier. Um ein gleichmäßiges Blotten zu gewährleisten, wurde beim Aufbau des Blots immer darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen befanden. Die Apparatur wurde mit dem Deckel (der Kathode) verschlossen und das Gel mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro Quadratzentimeter Gelfläche für 1,5 h geblottet.

Die Effizienz der Proteinübertragung auf die Membran wurde nach dem eigentlichen Blot-Vorgang mittels PonceauS-Färbung überprüft. Dafür wurde die Nitrozellulose-Membran für einige Minuten in PonceauS-Gebrauchslösung inkubiert und anschließend zur Differenzierung der Proteinbanden mit Wasser gewaschen. Durch das Abspülen des nicht gebunden PonceauS mit H_2O sind die Proteine als rote Banden zu erkennen. Eine gleichmäßige Färbung des Blots zeigt außerdem an, ob der Proteintransfer Luftblasen-frei erfolgt ist, oder ob gegebenenfalls durch Luftblasen nicht geblottete Bereiche entstanden sind.

Gleichmäßig geblottete Membranen wurden anschließend an die Ponceau Färbung für den Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern verwendet. Dafür wurden zunächst die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation mit der Blocklösung (3% Magermilchpulver in 1xPBS) für 30-60 Minuten bei RT unter Schütteln geblockt, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Nach der Blockierung wurde der Primärantikörper in

Blocklösung verdünnt und für 1.5h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x für je 10 Minuten in TBS/Tween gewaschen und anschließend für 1 h mit dem in TBS/Tween verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Es folgte ein weiteres dreimaliges Waschen wie oben beschrieben.

Die Detektion des Signals erfolgte über verstärkte Chemilumineszenz (ECL). Hierbei ist der sekundäre Antikörper mit einer HRP gekoppelt, die das Substrat der ECL umsetzt, was in einem Lumineszenz-Signal resultiert. Dies wird in der Dunkelkammer ausgenutzt um einen aufgelegten Röntgenfilm zu belichten. Da das Signal übereinstimmt mit der Position des Proteins im Gel (= Blot) kann zusätzlich ermittelt werden, welche Mol Masse das Protein hat. Dazu wurde auf die Membran 10 ml ECL-Lösung und 3,1 µl H_2O_2 gegeben und die Membran für 1 Minute darin inkubiert. Anschließend konnte ein Film durch Auflegen auf die Membran belichtet und mittels Entwicklungsmaschine entwickelt werden. Die Exposition der Filme wurde für unterschiedliche Zeiträume durchgeführt (30 – 300 sec.).

2.6.3 Nachweis von Proteinen in Gefrierschnitten

2.6.3.1 Allgemeine Immunhistochemie

Die Immunfluoreszenz-Analyse ermöglicht den Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern an fixierten Geweben. Für die Analyse wurden die Gefrierschnitte zunächst für 15 Minuten in 4% PFA fixiert. Danach wurde eine 3malige Waschung mit PBS durchgeführt, worauf eine Permeabilisierung mit 0.5 %Triton X-100 für 5 Minuten erfolgte. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde anschließend für 60 Minuten in 1% BSA in PBS inkubiert. Der Primärantikörper wurde in 1% BSA / PBS gelöst und die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit der Antikörper-Lösung inkubiert. Es schlossen sich wiederum drei Waschschritte mit PBS an, woraufhin die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (ebenfalls in 1% BSA / PBS) für 1h bei RT an. Nicht gebundene Sekundärantikörper wurden durch erneutes dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Für die Zellkernmarkierung wurden die Präparate 5 Minuten in einer DAPI-Lösung inkubiert (1:500 in PBS) und die Schnitte anschließend einmal in PBS und dann kurz in H_2O gewaschen. Schließlich wurden die Präparate in Polyvinylalkolohl Eindeckelmedium mit DABCO (Fluka) eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

2.6.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Sulfatid in Gewebe

Mit Hilfe des SulphI Antikörpers (Fredmann et al., 1988) wurde an Gewebeschnitten Sulfatid nachgewiesen.
Hierzu wurden Kryoschnitte langsam aufgetaut und mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden zunächst in 0,05% Glycin / PBS für 30 min inkubiert. Es folgte, nach einer 3-4-stündigen Inkubation mit 0,05% Tween 20, 1% BSA / PBS-Lösung, die Inkubation des primären Antikörpers Sulph (1:100 in 0,01% Tween-20, 1% BSA / PBS-Lösung) bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurde danach wieder mit PBS gewaschen und mit Polyvinylalkohol Eindeckelmedium eingedeckelt.

2.6.3.3 Alcianblau-Färbung

Die Akkumulation von Sulfatid im Gewebe wurde histologisch durch die Alcianblau-Färbung nachgewiesen. Hierzu wurden 12-14 µm dicke Kryoschnitte verwendet. Nach dem Auftauen, wurden die Schnitte zuerst mit PBS gewaschen, um etwaige Saccharosereste zu entfernen.
Für eine garantierte selektive Färbung von Sulfatid musste bei der verwendeten Scott-Lösung (2,5% Paraformaldehyd, 0,025 M Na-Acetat pH 5,7, 0,3 M $MgCl_2$) der pH genau eingestellt sein und das $MgCl_2$ immer frisch zur angesetzten Stocklösung zugegeben werden.
Zuerst wurden die Schnitte über 24h mit der Scott-Lösung fixiert (Präinkubation), wobei Lösung mindest dreimal gewechselt wurde. Danach wurde die Scott-Lösung durch die Färbelösung (0,025% Alcianblau 8 GX in Scott-Lösung) ersetzt und die Schnitte für weitere 24h über Nacht bei Raum Temperatur inkubiert. Das Prinzip der Alcianblau-Färbung beruht dabei darauf, dass das Alcianblau an die negative Ladung des Sulfatids im Gewebe bindet. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Scott-Lösung gewaschen, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu verringern. Dies erfolgte wiederum für 24h, wobei die Lösung ebenfalls dreimal gewechselt wurde.
Im Anschluss wurde zur Überprüfung der angefärbten Zellstrukturen eine Immunhistochemie (s. 2.2.2.) mit den neuronalen Antikörpern HRP-3 (Hepatoma-derived growth factor-related protein-3) sowie NeuN (neuronal nuclei) durchgeführt.

2.6.3.4 Immunhistochemie mittels ABC-Methode

Parafinschnitte wurden verwendet, wenn diese vorher durch eine Xylolreihe drei mal 5 Minuten deparafiniert und anschließend stufenweise durch abnehmende Alkoholkonzentrationen hydriert. Es folgte eine dreimalige Waschung in PBS. Die Behandlung von Kryoschnitten wurde an diesem Punkt begonnen. Um endogene Peroxidase Aktivität zu inaktivieren, wurden die Schnitte mit 0,3% H_2O_2 behandelt. Danach wurden die Präparate mit PBS gespült und es folgte eine Permeabilisierung mit 0,5 % Triton-X 100 / PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden nochmals mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden sie mit 2 % BSA für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Der primäre Antikörper wurde in 2 % BSA / PBS verdünnt und die Schnitte wurden mit der Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde zunächst der nicht gebundener Antikörper mit PBS ausgewaschen und die Schnitte mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (in 2 % BSA / PBS) für 1.5 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Herstellung des ABC-Komplexes wurde in der Zwischenzeit nach Anweisung des Herstellers Lösung A 1:100 in PBS verdünnt, gut durchmischt und mit 1:100 in PBS verdünnter Lösung B versetzt. Durch die anschließende Inkubation für 30 Minuten konnte sich so der Avidin-Biotinylierte Enzym-Komplex (ABC-Komplex) bilden. In dieser Arbeit wurde sich des Avidin-Biotinylierten HRP Systems bedient (VECTOR Laboratories).

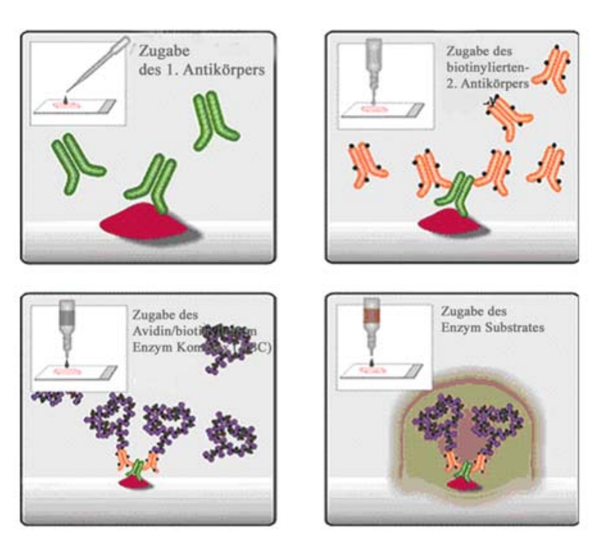


Abb. 2.3: Darstellung der Immunhistochemie mit der ABC-Methode (Quelle: VECTOR Laboratories).

Der ABC-Komplex wurde direkt nach der Inkubation des biotinylierten sekundären Antikörpers auf die Schnitte gegeben und für 1 h bei RT dort belassen. Durch die Bindung des

ABC-Komplexes an den biotinylierten Sekundärantikörper war somit das Antigen mit einem großen Komplex „markiert“, was zu einer deutlichen Signalverstärkung bei der Visualisierung führte. Diese wurde mittels der Substrate 3,3´-Diaminobenzidin (DAB) oder Histogreen wie folgt durchgeführt:

- Histogreen Substrat-Lsg: 2 Tropfen Histogreen Chromogen (Nr1)
  1ml Histogreen-Buffer (Nr.2) und dazu
  2 Tropfen H_20_2 (Nr.3); gut mischen

- DAB-Substrat-Lsg: 100µl 0,5% DAB-Lösung in 1ml TBS
  + 1µl H_2O_2, gut mischen

Bei Anfärbung der Schnitte mit HistoGreen wurden diese im Anschluss mittels einer Ethanolreihe (3 x 100% EtOH für 30 sec.) gefolgt von einer Xylolreihe (3 x 100% Xylol für 30 sec.) dehydriert. Die Schnitte wurden in DPX Einbettmedium eingebettet und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

2.6.4 Isolierung der Plasmamembran

Die Isolierung der Plasmamembran (und auch des Myelins) wurde unter Zuhilfenahme eines Saccharose-Gradienten durchgeführt. Diese Methode beruht darauf, dass die Plasmamembran, im Vergleich zu anderen zellulären Bestandteilen, eine geringe Dichte hat und deshalb in einem Saccharose-Gradienten „schwebt“. Für die Analyse (nach Li, Serwanski, Miralles et al. 2007 & Henn, Hansson and Hamberger, 1972) dienten Mausgehirne als Ausgangsmaterial. Diese wurden zunächst in 4 ml kalten Puffer A (10% Saccharose, 1 mM $NaHCO_3$ pH7.4, 1 mM $MgCl_2$, 0,5 mM $CaCl_2$, 0,5 mM EDTA, 1mM PMSF) mit einem Teflonstab Homogenisator (Potter S) bei einer Laufdrehzahl von 900 rpm bei 4°C homogenisiert. Vom Homogenat wurden je 2 x 100 µl Aliquots entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C gelagert. Das Homogenat wurde bei 1400 g für 10 Minuten und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde gesammelt und bei 4°C aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut in Puffer A homogenisiert und wiederum bei 1400 g für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem ersten vereinigt und wiederum bei 1400 g für 10 Minuten und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde dieser Überstand bei 13800 g für 10 Minuten bei 4°C pelletiert.

Das Pellet wurde in 9 ml 30% Saccharose aufgenommen, in Ultrazentrifugenröhrchen überführt, vorsichtig mit 2-3 ml 10,5% Saccharose überschichtet und für 2 h bei 20000 rpm und 4°C in der Ultrazentrifuge im Ausschwingrotor zentrifugiert. Bei diesem Zentrifugation-Schritt sammelte sich das Myelin aufgrund seiner Dichte in der Interphase zwischen 10,5% und 30% Saccharose. Dieses sozusagen schwebende, milchigweiße Myelin wurde abgenommen und zur Entfernung der Saccharose mit 5 mM Tris-HCl in PBS für je 30 Minuten bei 25000 rpm und 4°C gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl 5 mM Tris-HCl aufgenommen und bei -20°C gelagert. Anschließend wurde das resultierende Pellet aus dem 1. Saccharosegradienten erneut auf einen weiteren diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (35%-25%-10%) geladen und 2 h bei 22000 rpm und 4°C zentrifugiert.

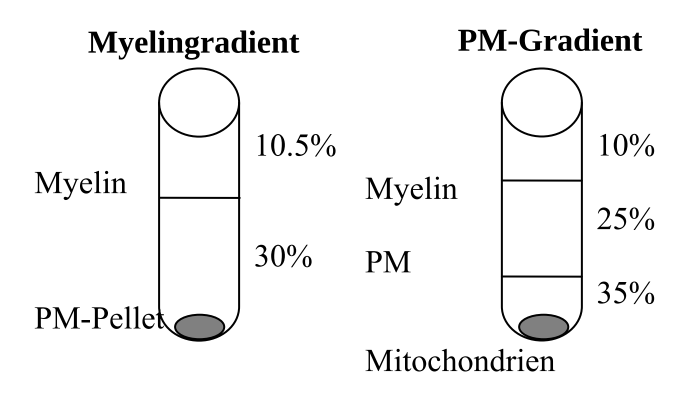


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der eingesetzten Sucrose-Gradienten.

Die schwebende Plasmamembran wurde aus der Phase zwischen 35 % - 25 % Saccharose abgenommen, mit 2 ml 5 mM Tris-HCl gemischt und 4-5 x durch Invertieren gemischt. Hiernach wurden zu dem Gemisch weitere 8 ml 5 mM Tris-HCl hinzugefügt und für je 30 Minuten bei 25000 rpm und 4°C gewaschen.

Das abschließende Plasmamembranpellet wurde in 200 µl 5 mM Tris-HCl aufgenommen, in je 2 x 100 ml Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Homogenate und Plasmamembran wurden im weiteren Verlauf einer Lipidanalyse nach Bligh-Dyer (s. 2.6.6.3) sowie einer Western-Blot-Analyse auf angereicherte Proteine in der Plasmamembranfraktion unterzogen.

2.6.5 Cerebrosid-Sulfotransferase-Assay

Die transfizierten Zellen wurden in 20 mM Tris-HCl / 150 mM NaCl (pH 7,0) mit zugegebenen Protease Inhibitoren lysiert und der postnukleare Überstand auf eine Proteinkonzentration von 5-10 mg/ml eingestellt (s. 2.6.2.1).
Für jede Probe wurden 5 µl GalCer (4 mg/ml) und 10 µl 1% Triton X-100 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in der Speed Vac eingedampft. Danach erfolgte die Zugabe von 40 µl Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl Lysat gestartet und für 60-120 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch das Zuführen von 1 ml Chloroform / Methanol (2:1) wurde die Reaktion gestoppt. Dann wurden 200 µl 150 mM NaCl hinzugegeben, für 1 Minute gut durchmischt und für 5 Minuten bei 1400 g zentrifugiert. Die organische Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit TUP (Methanol / 150 mM NaCl / Chloroform, 48:47:3) gewaschen. Das Gemisch wurde erneut in der Speed Vac eingedampft, die Lipide wurden in 20 µl von Chloroform / Methanol (2:1) gelöst, auf eine HPTLC Silica Gel Platte aufgetragen und in Chloroform / Methanol / Wasser (65:25:4) entwickelt.

2.6.6 Extraktion von Lipiden aus Zellen

2.6.6.1 Vorbereitung von LiChroprep® RP-18

Die LiChroprep® RP-18-„Kügelchen“ wurden zunächst in 2 Volumen Chloroform / Methanol (2:1) suspendiert und dann 30 Minuten gerührt. Anschließend wurden sie sedimentiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurden die Kügelchen mit 2 Volumen Methanol gewaschen und in Methanol bei 4°C gelagert.

2.6.6.2 Lipidextraktionen (modifiziert nach van Echten-Deckert, 2000)

Lipide wurden sowohl aus Zellen wie auch aus Mausgewebe extrahiert. Zellen wurden zunächst von der Zellkulturschale gelöst und pelletiert. Zu dem Zellpellet wurden 1ml Methanol und 2ml Chloroform (Methanol / Chloroform 1:2) hinzugegeben und mit Hilfe des Ultra-Turrax zerkleinert.
Das Mausgewebe wurde in 2 ml kaltem TBS mit 1mM PMSF mittels des Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend bei 100000 g und 4°C pelletiert.

Die Suspensionen wurde in einem 10fachen Überschuss an Chloroform / Methanol (2:1) aufgenommen und in ein Pyrex-Röhrchen überführt Dieses Homogenat wurde danach mit einem kleinen Rührfisch für 4 Stunden bei 56°C gerührt, um apolare Lipide in Lösung zu bringen. Durch nachfolgende Zentrifugation bei 1300 rpm (10 Minuten, 4°C) wurde unlösliches Material und Gewebereste sedimentiert. Der Überstand wurde in einem frischen Pyrex-Röhrchen gesammelt und das Sediment erneut extrahiert. Dafür wurden 6-8 ml Chloroform/ Methanol (1:1) hinzugegeben. Die Suspension wurde wieder mit einem kleinen Rührfisch für 4 Stunden bei 56°C gerührt. In dieser 2. Extraktion wurden die polaren Lipide freigesetzt. Durch erneute Zentrifugation, 10 Minuten mit 1300rpm bei 4°C, wurde unlösliches Material sedimentiert, der Überstand wurde abgenommen und mit dem Überstand der ersten Extraktion vereinigt. Dieses Extrakt wurde im 50°C-Wasserbad erhitzt und unter Einblasen von Stickstoff eingedampft. Die so erlangten Gesamtlipide wurden in 300 µl $CHCl_3$/MeOH, (1:1) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Um die Glycerophospholipide aus der Gesamtlipid-Fraktion zu verseifen, wurden diese in 2,5 ml Methanol aufgenommen und 5 Minuten im Ultraschallwasserbad gelöst. Dann wurden 62,5 µl 4 M Natriumhydroxid hinzugegeben. Diese Lösung wurde unter Rühren für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Hydrolyse wurde anschließend durch Zugabe von 10 µl Essigsäure gestoppt, die Lösung wie bereits beschrieben im 50°C-Wasserbad erhitzt und erneut unter Stickstoff eingedampft. Die Lipide wurden in 1 ml Methanol aufgenommen und 5 Minuten im Ultraschallwasserbad gelöst. Zur Entsalzung wurden die Lipide auf eine folgendermaßen präparierte Säule gegeben (Schwarz et al., 1997; van Echten-Deckert, 2000): Eine Pasteurpipette wurde mit Glaswolle gestopft. Die in Methanol gelagerten LiChroprep® RP-18-„Kügelchen“ wurden resuspendiert und auf die Glaswolle pipettiert. Zur Äquilibrierung der Säule wurde diese anschließend zweimal mit 1 ml 0,1 M Chloroform / Methanol / Kaliumchlorid (3:48:47) gewaschen. Die Lipidlösung wurde mit 1 ml 300 mM Ammoniumacetat versetzt und anschließend auf die Säule gegeben. Das Pyrex-Röhrchen, das die Lipidlösung beinhaltete, wurde zweimal mit je 0,5 ml Methanol / 200mM Ammoniumacetat (1:1) gewaschen und die resultierende Lösung auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule sechs- bis achtmal mit je 1 ml destilliertem Wasser gespült. Um das Eluat aufzufangen wurde ein frisches Pyrex-Röhrchen unter die Säule gestellt.

Zur Elution der Lipide wurde dann zunächst 1 ml Methanol, dann sechsmal je 1ml Chloroform / Methanol (1:1) auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde wie bereits erläutert im 50°C warmen Wasserbad und unter Einblasen von Stickstoff eingedampft. Die eingedampften Lipide wurden abschließend in 300 µl Chloroform / Methanol (1:1) gelöst und in ein

Glasfläschchen mit Teflondeckel überführt. Die Lipide wurden bis zur Analyse bei –20°C gelagert.

2.6.6.3 Lipidextraktionen (modifiziert nach Bligh und Dyer, 1959)

Die Plasmamembranfraktionen (vgl. 2.6.4) wurden gemäß einer nach Bligh-Dyer modifizierten Lipidextraktion unterzogen. Dazu wurden zu den 100 µl Ausgangsmaterial 375 µl Chloroform / Methanol (1:2) gegeben und gut durchgemischt.
Dann erfolgte die Zugabe von 125 µl Chloroform, wurde gute durchmischt und 125 µl H_2O zugegeben. Nach dem Mischen der Lösung wurde diese bei 3000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die organische Phase (untere) wurde vorsichtig entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in der Speed Vac eingedampft.
Die Lipide wurden in 200 µl Chloroform / Methanol (1:1) gelöst und in ein Glasfläschchen mit Teflondeckel überführt und bei –20°C gelagert.

2.6.6.4 Auftrennen von Lipiden auf DC-Platten - Dünnschichtchromatographien

Die Dünnschichtchromatographie (TLC) wurde zur Analyse der extrahierten Lipide angewandt.
Die Lipide wurden mit Hilfe des „TLC-Modul“ von Camag auf eine HPTLC Kieselgel 60 Platte aufgetragen. Für die erste TLC-Platte wurden 10 µl der Lipidlösung aufgetragen. Anhand der Signale dieser Platte wurde der Lipidgehalt anhand von Cholesterin berechnet (s.u.) und somit für jede weitere TLC die aufgetragenen Lipidmengen auf Cholesterin normalisiert aufgetragen. Die beladene TLC-Platte wurde in eine Chromatographiekammer mit dem entsprechenden Laufmittel (soweit nicht anders vermerkt Chloroform, Methanol und destilliertes Wasser im Verhältnis 35:15:2) gestellt. Sobald die Lauffront des Laufmittel bis ungefähr 1-2cm unter den Plattenrand gelaufen war, wurde die Platte aus der Kammer genommen und mittels eines Föns kurz getrocknet. Anschließend wurde die Platte großzügig mit Kupfersulfat-Färbelösung eingesprüht, kurz mit einem Fön getrocknet, danach fünf Minuten bei 180°C zur Visualisierung der Signale gebacken und abschließend eingescannt.
Die Quantifizierungen der Lipidbanden erfolgte densitometrisch mit Hilfe der AIDA Software (Advanced Image Data Analyzer; Raytest, Straubenhardt, Deutschland). Für die einzelnen Lipide wurden mit bekannter Konzentrationen Eichgeraden erstellt.

Für Ganglioside wurden das Laufmittel Chloroform / Methanol / 0.22% $CaCl_2$ (60:35:8) und für die Cerebroside Chloroform / Methanol / H_2O bidest. (65/25/4) genutzt.

2.6.6.5 Immundetektion von Sulfatid auf DC-Aluminiumfolien

Das Protokoll der „Thin Layer Chromatography Overlay“ wurde zum ersten Mal durch Bethke und Kollegen publiziert (Bethke et al., 1986) und in der vorliegenden Arbeit modifiziert zur Immundetektion von Sulfatid auf TLC-Platten nach erfolgter Lipidauftrennung angewendet.

Die Dünnschichtchromatographie wurde für die Immundetektion mit DC-Aluminiumfolien 20x20cm Kieselgel 60 durchgeführt. Die Lipide wurden mit dem „TLC-Sampler“ von Camag aufgetragen, mit jeweils einer Standardlipidlösung an beiden Rändern der DC-Platte. Die beladene Platte wurde in eine Chromatographiekammer mit Laufmittel gestellt. Nachdem die Lauffront bis 1 cm an den oberen Rand der Platte gelaufen war, wurde sie herausgenommen und kurz getrocknet. Anschließend wurden die beiden äußeren Spuren, die die Standardlipidlösung trugen, abgetrennt und entwickelt. Danach wurden die Spuren wieder an die TLC-Platte angelegt und der Bereich der gesuchten Lipide ausgeschnitten. Dieser Teil der TLC-Platte wurde nachfolgend weiterverarbeitet. Er wurde zweimal 1 Minute mit 0,3% „Plexigum“-Lösung gewaschen, zwischendurch kurz mit einem Fön getrocknet, dann 1 Stunde bei 55°C getrocknet und in Tris-HCl-Puffer 200mM (pH 7,5) für ein weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde erneut kurz mit einem Fön getrocknet und eine Stunde bei Raumtemperatur in 2% BSA und 0,05% Tween-20 in PBS inkubiert.

Nach der Blockierung wurde die Platte mit dem ersten Antikörper (Maus-anti-SulphI, 1:100 in Blockinglösung) für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit PBS für je 15 Minuten gewaschen und zwischendurch kurz mit einem Fön getrocknet.

Der sekundäre Antikörper (alkalische Phosphatase konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper; 1:500) wurde ebenso für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte viermal mit PBS für je 10 Minuten gewaschen und zwischendurch kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Die Platte wurde in NBT/BCIP-Färbelösung je nach Intensität der Banden wenige Minuten bis über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und entwickelt. Die Teile der DC-Aluminiumfolie, die nicht zur Immundetektion herangezogen wurden, dienten der Visualisierung der Lipidzusammensetzung durch Kupfersulfat-Färbelösung.

2.6.7 ESI-MS (Elektrospray Ionisation-Massen Spektrometrie) von Lipiden

Elektorspray-Ionisation-Massen-Spektrometrie wurde angewendet, um die quantitativen Unterschiede in den Lipiden verschiedener Genotypen, sowie die verschiedenen Fettsäuren-Kettenlängen von Sulfatid zu bestimmen.
Hierzu wurde 5 µl Lipide über eine Silica-Säule (LiChroCART 125-4 Si-60; MERCK) laufen gelassen, um eine bessere Auftrennung und auch nochmalige Reinigung der Lipide zu gewährleisten. Danach erfolgte der Transfer in die Elektrospray Kapillare bei 4000 V. Als Kollisionsgas diente Argon.
Die negativ geladenen Glykolipide wie Sulfatid wurden im negativen Modus gemessen. Für jede Probe wurde ein Spektrumlauf von 15 Minuten durchgeführt. Als Wasch- und Elutionslösung dienten A) Wasser und 1% NH_4OH-4% (w/v), B) Acetonitril-0%, C) Isopropanol-26% (w/v), D) n-Heptan-70% (w/v). Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Werner Tomberg durchgeführt.

2.7 Mäuse

2.7.1 Tierexperimentelles Arbeiten

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes.
Alle Mauslinien wurden mit Futter und Wasser ad libidum in einem 12-stündigen Tag-Nacht Rhythmus gehalten. Für die Gewebeentnahme wurden die Tiere zunächst mit Diethylether betäubt und dann durch zervikale Dislokation getötet.
Um histologische Schnitte für histochemische Untersuchungen zu erhalten, wurden die Tiere zunächst perfundiert. Hierfür wurden die Tiere zunächst durch eine intraperitonale Injektion mit Avertin (15 µl pro g Körpergewicht) betäubt, dann durch die linke vordere Herzkammer eine Kanüle eingestochen, über die 1% Procain in PBS injiziert wurde, um eine Verengung der Arterien zu verhindern. Diese Injektion wurde für 10 Minuten durchgeführt, bevor eine Perfundierung mit 4% PFA bzw. 6% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3 vorgenommen wurde (für ca 20 Minuten). Injektion mit Procain sowie Perfusion erfolgten mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (60 x/Minute). Die perfundierten Mäuse wurden über Nacht weiter in 4% PFA bzw. 3% Glutaraldehyd bei 4°C fixiert.

2.7.2 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung diente zur Überprüfung der Maus-Genotypen und wurde standardmäßig an ca. 3-4 Wochen alten Tieren durchgeführt. Dazu wurde den Mäusen ein kleines Stück der Schwanzspitze (ca. 0,5-1 cm) entnommen und über Nacht bei 56°C schüttelnd in 750 µl Lysepuffer mit 5 µg/ml Proteinase K lysiert. Die vollständig aufgelöste Schwanzspitze wurde am nächsten Morgen zuerst mit 250 µl 6 M NaCl versetzt, weitere 5 Minuten bei 56°C inkubiert und 10 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu pelletieren. 750 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach mehrmaligem leichten hin und her Schwenken fiel die DNA aus und wurde für 3 Minuten bei 1300 rpm abzentrifugiert. Das so erhaltende DNA-Pellet wurde daraufhin mit 70% EtOH gewaschen und getrocknet, und anschließend in 300 µl dH_2O aufgenommen. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden ca. 300 ng genomische Maus-DNA in PCR-Analysen eingesetzt.
Die PCR-Bedingungen für eine Genotypisierung einer ASA-, ApoE-defizienten Maus und einer transgenen Thy1-CGT Maus sahen wie folgt aus:

Programm:

5 min 94°C

30 sec. 94°C
30 sec. 50°C$_{(CST),}$ (56°C$_{(CGT,ASA,)}$;68°C$_{(ApoE)}$)
60 sec. 72°C
} x 32

10min. 72°C

2.7.3 Verhaltenstest - Open Field Test

Zur Bestimmung möglicher Veränderungen in den Verhaltensweisen transgener Mäuse wurden sog. Open Field Tests durchgeführt. Der „Open Field“ Aktivitätstest wurde dazu genutzt, die Lokomotorische Aktivität von Mäusen zu messen und diente des Weiteren zur Analyse möglicher motorischer Defizite, Nervosität oder Ängstlichkeit.
Folgende Parameter wurden gemessen: Anzahl und Zeit der Sprünge sowie des Aufrichtens, Durchschnittsgeschwindigkeit, zurückgelegte Strecke sowie die Zeit im Zentrum und im Ruhezustand. Dazu wurden die Mäuse einzeln für je 5 Minuten in eine Box des Typs ENV-515-16, mit einer Größe vom 44 cm x 44 cm gesetzt, deren Boden und Plexiglaswände Lichtschranken aufwiesen, die mit einem Computer verbunden waren. Jedes Mal, wenn eine

Maus eine Lichtschranke passierte, wurde es mit Hilfe der Activity Software Version 4.36 (Med. Associates Inc., St. Albans, USA) vermerkt.

2.7.4 Statistische Auswertung

Die aus dem Aktivitätstest erhaltenen Daten wurde mit dem Programm Statistika ausgewertet und die Ergebnisse als arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Standardfehler (SEM; wie angegeben) dargestellt. Zur Berechnung biochemischer Signifikanzen wurde die Varianzanalyse nach R. A. Fisher angewandt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine lysosomale Speicherkrankheit die auf einen Gendefekt des Enzyms Arylsulfatase A (ASA) beruht. Die ASA katalysiert den ersten Schritt im Abbau des Sphingolipids 3-*O*-Sulfo-Galaktosylceramid (Sulfatid). Das Enzym entfernt die Sulfatgruppe vom polaren Teil des Lipids. Wenn dieser Schritt aufgrund des ASA-Enzymdefektes nicht mehr durchgeführt werden kann, wird Sulfatid nicht mehr abgebaut und akkumuliert in den Lysosomen. Die Synthese des Sulfatids erfolgt im Golgi-Apparat durch das Enzym Cerebrosid Sulfotransferase (CST).

Mit Hilfe von MLD-Mausmodellen soll die molekulare Pathologie sowie die Rolle von Sulfatid untersucht werden. Dazu wurden zunächst *in-vivo*-Untersuchungen von ASA-Knockout- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen durchgeführt, um zum einen den Einfluss von Lipiden und deren Menge, vor allem an Sulfatid, zu bestimmen und zum anderen die morphologische Lokalisation von Sulfatid zu untersuchen. Diese Ergebnisse werden im ersten Abschnitt gezeigt (3.1).

Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils (3.2) sind die Untersuchungen auf histologischer (3.2.1) und biochemischer Ebene (3.2.2) der Thy-1-CGT-Mäuse aufgeführt, die die Cerebrosid-Galaktosyltransferase (CGT) überexprimieren. Der dritte Teil der Arbeit (3.3) befasst sich mit der CST. Hierzu wurden verschiedene Fusionskonstrukte der CST *in vitro* in einem Zellkulturmodell untersucht, um die Lokalisation der CST genau zu klären und ein Expressionssystem zu etablieren, bei dem größere Mengen an CST gewonnen werden können. Die Produktion von größeren Enzym-Mengen soll es ermöglichen, Inhibitoren gegen die CST zu finden.

3.1 MLD-Mausmodell: ASA- und ASA/ApoE–Knockout Mäuse

ASA-defiziente Mäuse, die als Mausmodell der MLD erzeugt worden sind (Hess et al. 1996) zeigten eine Akkumulation von Sulfatid, ähnlich wie bei der menschlichen MLD. Untersuchungen an Gehirnschnitten von ASA-defizienten Mäusen zeigten Sulfatid-Akkumulation in den Neuronen (Wittke et al. 2004). Allerdings ist es noch unklar, ob das Sulfatid zu den Neuronen importiert wird oder ob die Neuronen es selbst synthetisieren. X. Han (2002) zeigte, dass in ApoE-Knockout-Tieren im Cortex ein erhöhter Gehalt an Sulfatid vorhanden war und schloss daraus, dass Apolipoprotein-E für den Transport von Sulfatid zu den Neuronen zuständig ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Doppel-Knockout-Maus ASA/ApoE erzeugt und analysiert. Damit sollte die Frage geklärt werden, ob die ASA/ApoE-defizienten Mäuse eine verstärkte Sulfatid-Speicherung besitzen und ApoE als Sulfatid-Transporter zu den Neuronen notwendig ist. Die ASA-Knockout-Mäuse dienten als Kontrolle, um die in den Neuronen vorhandene Sulfatid-Akkumulation nachzuweisen und um den Sulfatid-Gehalt vergleichen zu können.

3.1.1 Analyse der Lebensspanne der verschiedenen Knockout Genotypen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden vier Genotypen untersucht: ASA-Knockout, ApoE-Knockout, ASA/ApoE-Knockout und Wildtyp (wt), auf C57BL/6-Hintergrund. Die Doppel–Knockout-Mäuse ASA/ApoE wurden durch die Verpaarung der ASA-Knockout- mit der ApoE-Knockout-Maus erzeugt.

Für die Erstellung einer Überlebenskurve (Abb.3.1) wurden keine Tiere berücksichtigt, die bereits für andere Untersuchungen verwendet wurden. Die maximale Lebensdauer der ASA/ApoE-Knockout-Mäuse ($n = 29$) und auch der ASA-Knockout-Mäuse ($n = 30$) war im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ($n = 29$) verkürzt. In der Abbildung 3.1 ist zu erkennen, dass die mittlere Lebensdauer bei allen vier Genotypen etwa gleich ist. Eine erhöhte Sterberate wurde erst im Alter von ca. 1,5 Jahren bei den ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Tiere beobachtet. Bei den ASA/ApoE-Knockout-Mäusen wurde eine Reduzierung der Lebensdauer im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren festgestellt. Nur sehr wenige Knockout-Tiere erreichten wie die Wildtyp-Tiere eine normale Lebensdauer von zwei Jahren und älter.

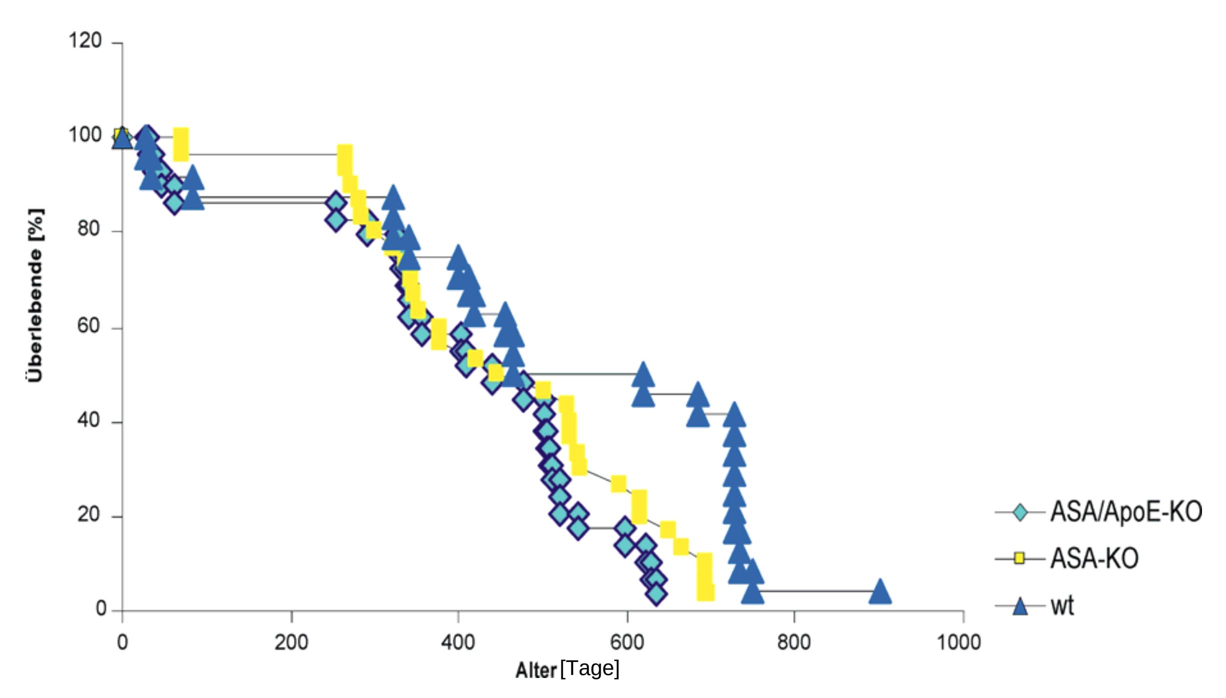


Abb. 3.1: Überlebenskurve der ASA/ApoE-Knockout-, ASA-Knockout- und Wildtyp-Mäuse (wt). Die ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Tiere wiesen eine geringere maximale Lebensdauer auf als die Wildtyp Mäuse. Die mittlere Lebensdauer ist bei allen Tieren gleich. Es wurden beide Genera in die Kaplan-Meier Überlebenskurve mit einbezogen. Wildtyp n= 29; ASA-KO n= 30; ASA/ApoE-KO n= 29.

3.1.2 Biochemische Analysen der ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäuse: Analyse der Sphingolipide im Cortex und im restlichen Gehirn

Aufgrund von Versuchen an ApoE-Knockout-Mäusen wurde ein Modell erstellt, nachdem der Transport von Sulfatid von Astrozyten zu den Neuronen mit Hilfe des ApoE-Protein erfolgt (Han et al. 2002, Cheng et al. 2008). Um zu überprüfen, ob die ApoE-Defizienz in Kombination mit der ASA-Defizienz einen Effekt auf den Sulfatid-Gehalt in Neuronen bewirkt, wurde die Sulfatid-Speicherung in den Tieren biochemisch durch Lipidanalyse und histologisch mittels verschiedener Antikörper gegen Neuronen-spezifische Proteine untersucht.

Für die Analyse wurden je Genotyp drei Tiere der Alterstufen 12 Monate und 18-24 Monate verwendet, um eine quantitative Auswertung der vorhandenen Lipidmengen zu ermöglichen. Für das Alter 18-24 Monate wurden die Genotypen Wildtyp, ASA-Knockout und ASA/ApoE-Knockout verwendet. Für die Analysen wurden ApoE-Knockout-Mäuse im Alter von 12 Monate verwendet, da zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch keine Tiere im Alter von 18-24 Monaten vorhanden waren. Aus dem Cortex und dem restlichen Gehirn wurden die Lipide isoliert und zunächst mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. In der Abbildung 3.2 sind die qualitativen Analysen der Sphingolipide sowie deren Quantifizierung dargestellt.

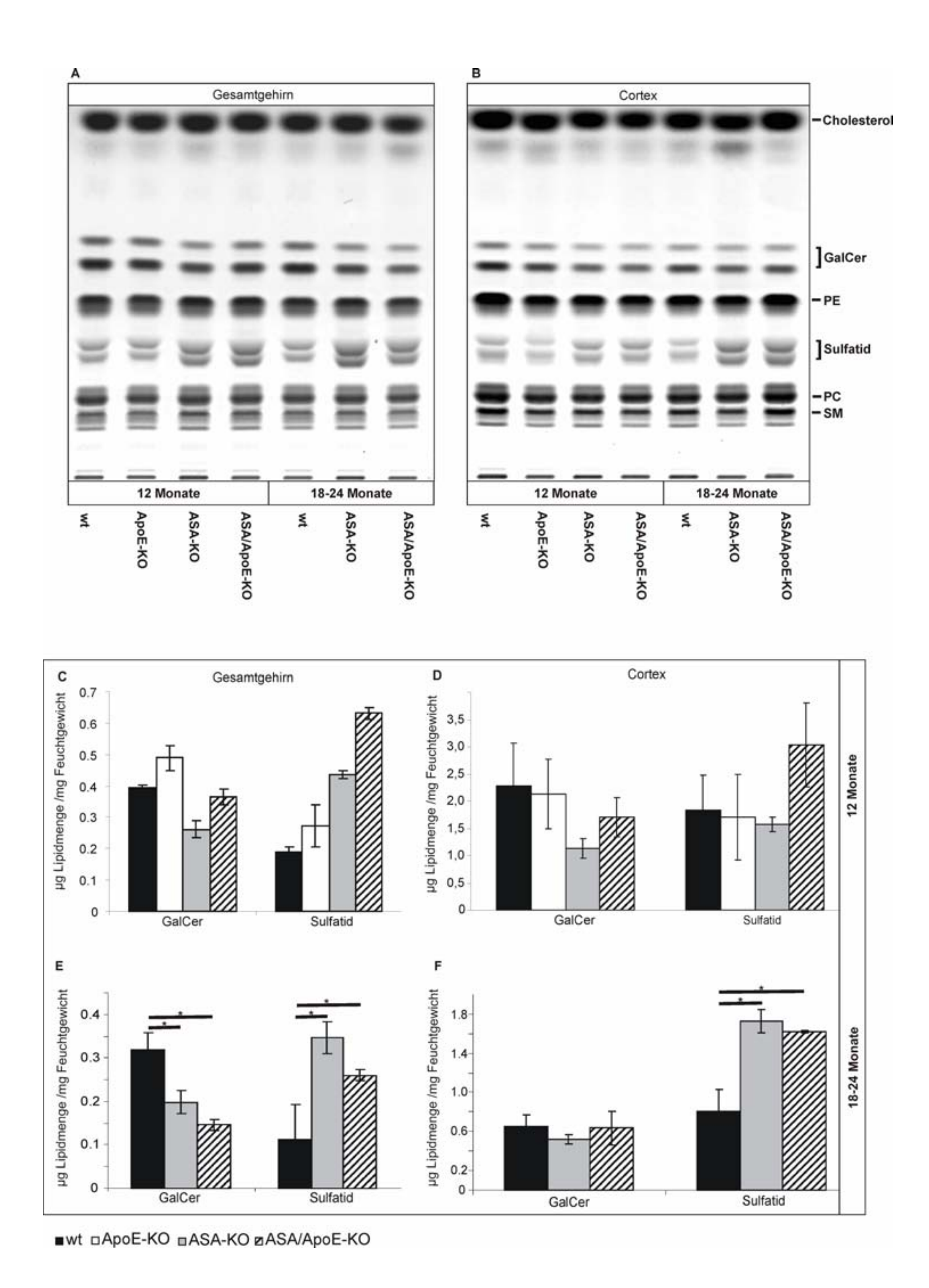


Abb. 3.2: Analyse und Quantifizierung der Lipide des Cortex und des Gesamtgehirns von 12 und 18-24 Monate alten Mäusen. Analysiert wurden die Lipide des Gehirns (mit Ausnahme des Cortex, der entfernt worden war) (A, C, E) und die Lipide des Cortex (B, D, F). Die Lipide wurden auf eine HPTLC Kieselgel 60 Platte aufgetragen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Lipidzusammensetzung je Genotyp. Insgesamt wurden je Genotyp n = 3 Tiere untersucht. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 65:25:4. C-F zeigen die quantitative Auswertung der Lipide GalCer und Sulfatid des Gesamtgehirns im Alter von 12 Monaten (C) und 18-24 Monaten (E), sowie des Cortex im Alter von 12 Monaten (D) und 18-24 Monaten (F) dargestellt. Ein Stern zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test, $p < 0.05$). GalCer = Galaktosylceramid, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin.

Die Analyse der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie ließ Unterschiede im GalCer- und im Sulfatid-Gehalt zwischen Wildtyp und den ASA-Knockout- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen erkennen, aber keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und ApoE-Knockout- und zwischen ASA-Knockout- und ASA/ApoE-Knockout-Tieren. Bei den ASA-Knockout-Mäusen ist sowohl im Cortex wie auch im restlichen Gehirn bereits nach 12 Monaten eine stärkere Sulfatid-Bande vorhanden, die nach 18-24 Monaten noch intensiver ist. Die quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatographie von jeweils drei Genotypen zeigte im Cortex nach 12 Monaten (D) noch keinen signifikanten Unterschied. Im restlichen Gehirn war aber ein Anstieg der Sulfatid-Menge in den ASA-Knockout und ASA/ApoE-Knockout Tieren festzustellen (C). Bei den älteren Tieren von 18-24 Monaten ergab die Quantifizierung einen signifikanten Unterschied in der Sulfatid-Menge zwischen Wildtyp und ASA-Knockout und ASA/ApoE-Knockout. Dieser Anstieg an Sulfatid war in der Analyse jeweils für beide Bereiche, Cortex und restliches Gehirn, statistisch signifikant. Die Quantifizierung von Galaktosylceramid (GalCer) ergab keinen signifikanten Unterschied im Alter von 12 Monaten. Jedoch konnte im restlichen Gehirn eine Reduktion an GalCer im Alter von 18-24 Monaten festgestellt werden.

Um eine genauere Analyse der molekularen Sulfatid-Spezies im Gehirn zu erhalten, wurden in dieser Arbeit die Sphingolipide mit Hilfe einer Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht. Diese Technik basiert auf der Desolvatisierung, d.h. auf dem Transfer von Ionen aus der Lösung in die Gasphase, was einen endergonischen Prozess darstellt. Im elektrischen Feld werden die Ionen bei Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert. Die Moleküle bleiben intakt und ihre Molekülmasse kann im angeschlossenen Massenspektrometer bestimmt werden.

In Neuronen und Astrozyten wurde hauptsächlich kurzkettiges Sulfatid (C18:0) gefunden (Berntson et al., 1998; Issac et al., 2006), wohingegen langkettiges C24:1-Sulfatid im Myelin vorhanden ist (Vos et al., 1994). Eine genaue Bestimmung der Sulfatid-Spezies kann, wenn zum Beispiel ein erhöhter C18:0-Sulfatid-Gehalt vorliegt, erste Anzeichen auf eine mögliche Sulfatid-Anreicherung in Neuronen ergeben.

In den folgenden Abbildungen sind exemplarisch die Massenspektren der mittels ESI-MS gemessenen deprotonierten Sphingolipide des Cortex (Abb.3.3) und des restlichen Gehirns (Abb.3.4) von ASA-Knockout- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen, sowie Wildtyp- und ApoE-Knockout-Mäusen dargestellt. Für diese Analyse wurden die Gesamtlipide verwendet, die bereits mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie analysiert worden waren.

Eine Ionen-Abtastung wurde im negativen Modus durchgeführt, um altersbedingte Veränderungen in der molekularen Spezies von Sulfatid im Cortex und im restlichen Gehirn

von Wildtyp-, ApoE-Knockout-, ASA-Knockout- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen zu charakterisieren. Repräsentative Massenspektren von den jeweiligen Genotypen im Alter von 12 Monaten und 18-24 Monaten sind für den Cortex in Abbildung 3.3 A-D und für das restliche Gehirn in Abbildung 3.4 A-D dargestellt. Die ASA-Knockout- und die ASA/ApoE-Knockout-Mäuse zeigten bereits (Abb. 3.3) nach 12 Monaten im Cortex einen erhöhten kurzkettigen Fettsäure C18:0 Sulfatid-Derivat-Wert (Abb. 3.3 A, C), der auch bei den älteren (18-24 Monate) Tieren, zu finden war (Abb. 3.3 B, D). Im Vergleich zu den Wildtyp- und den ApoE-Knockout-Mäusen ist eine deutliche Signifikanz sichtbar (Abb. 3.3 C, D). Ein erhöhter Peak bei 806.7 m/z, der charakteristisch für C18:0 Sulfatid ist, ist in den Spektren (Abb. 3.3 A, B) klar erkennbar. Des Weiteren ist ein altersabhängiger Anstieg an langkettiger Fettsäure C24:1-Sulfatid bei beiden Knockout-Mausstämmen im Alter von 18-24 Monaten festzustellen (3.3-D). Ähnliche Ergebnisse sind auch im restlichen Gehirn bei den ASA-Knockout- und den ASA/ApoE-Knockout-Mäusen zu beobachten (Abb. 3.4 A-D). Zwar war im Alter von 12 Monaten noch kein wesentlicher Unterschied festzustellen (Abb. 3.4 A, C), allerdings ändert sich das bei den älteren Mäusen. Hier ist ein signifikanter Unterschied von Wildtyp- zu den ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen zu sehen. Sowohl die kurz- als auch die langkettigen Sulfatid-Spezies C18:0 und C24:1 sind deutlich erhöht, wie anhand der statistischen Auswertung gezeigt ist (Abb. 3.4 D).

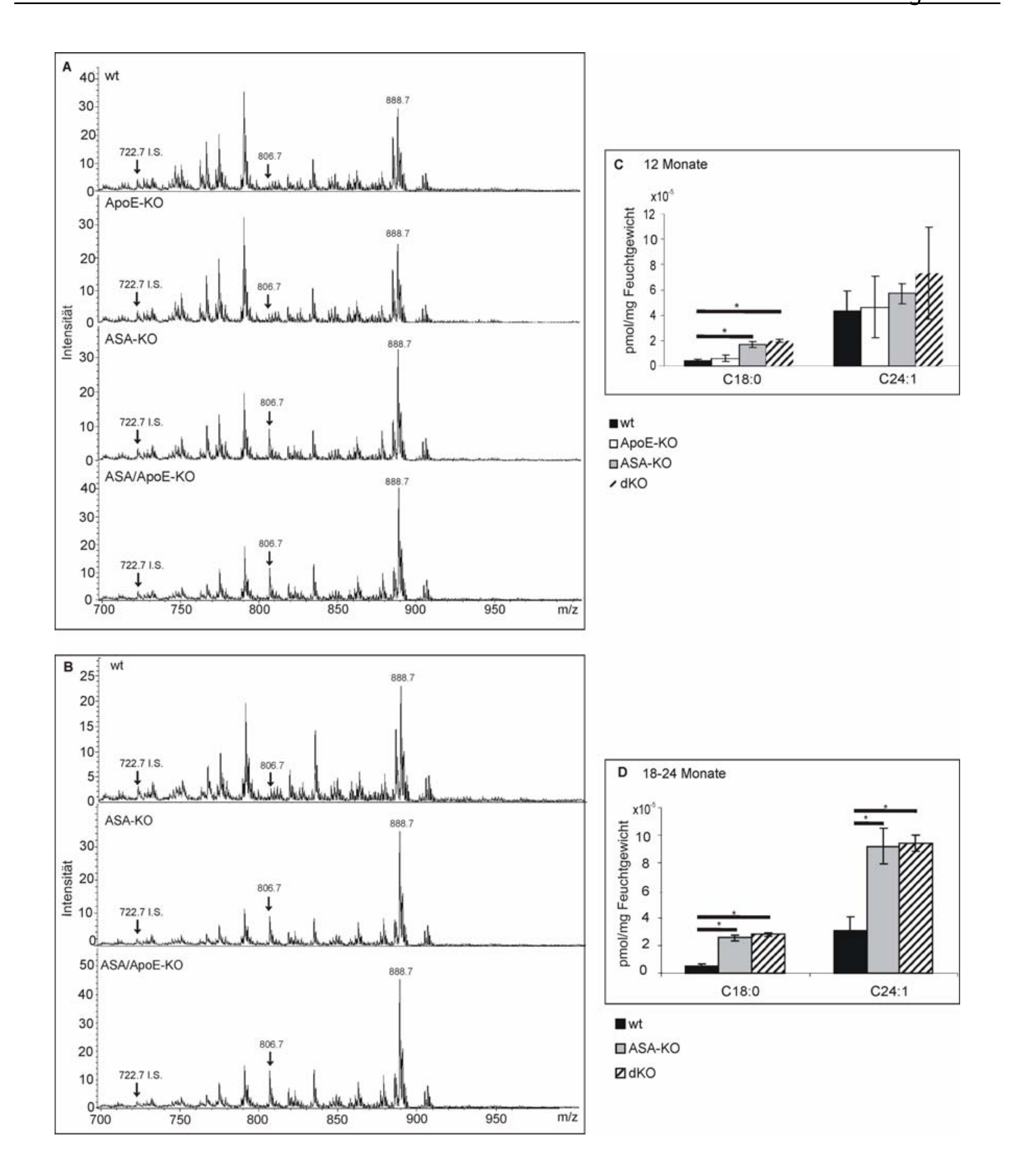


Abb. 3.3: Massenspektren und quantitative Auswertung der aus dem Cortex isolierten Lipide. Gesamtlipide, die aus dem Cortex 12 und 18-24 Monate alter Mäuse isoliert wurden, wurden mittels einer ESI-Ionenfalle im negativen Ionenmodus auf ihre Sulfatid-Masse hin untersucht. Dargestellt sind die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse (m/z). Jeweils eine repräsentative Analyse von insgesamt drei unterschiedlichen Tieren pro Genotyp (n = 3) ist in A (12 Monate) und B (18-24 Monate) dargestellt. Die Zahlen zeigen die Massenpeaks der deprotonierten Sulfatide ($M\text{-}H^-$) entsprechend ihrer Fettsäurekette an. Der Peak 722.7 m/z entspricht dem Sulfatid-Derivat C12:0, der als interner Standard (IS) eingesetzt wurde. Der Peak 806.7 m/z entspricht einem Sulfatid mit einem C18:0-Fettsäurerest. Der Sulfatid-Derivat Peak 888.7 m/z entspricht einem C24:1-Fettsäurerest. Die Pfeile kennzeichnen zum einen den IS- und zum anderen den C18:0-Peak, der im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. C-D stellt die quantitative Auswertung des C18:0- und C24:1-kettigen Sulfatid-Gehalts des Cortex im Alter von 12 Monaten (C) und 18-24 Monaten (D) dar. Ein Stern zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied (T-Test, $p < 0.05$).

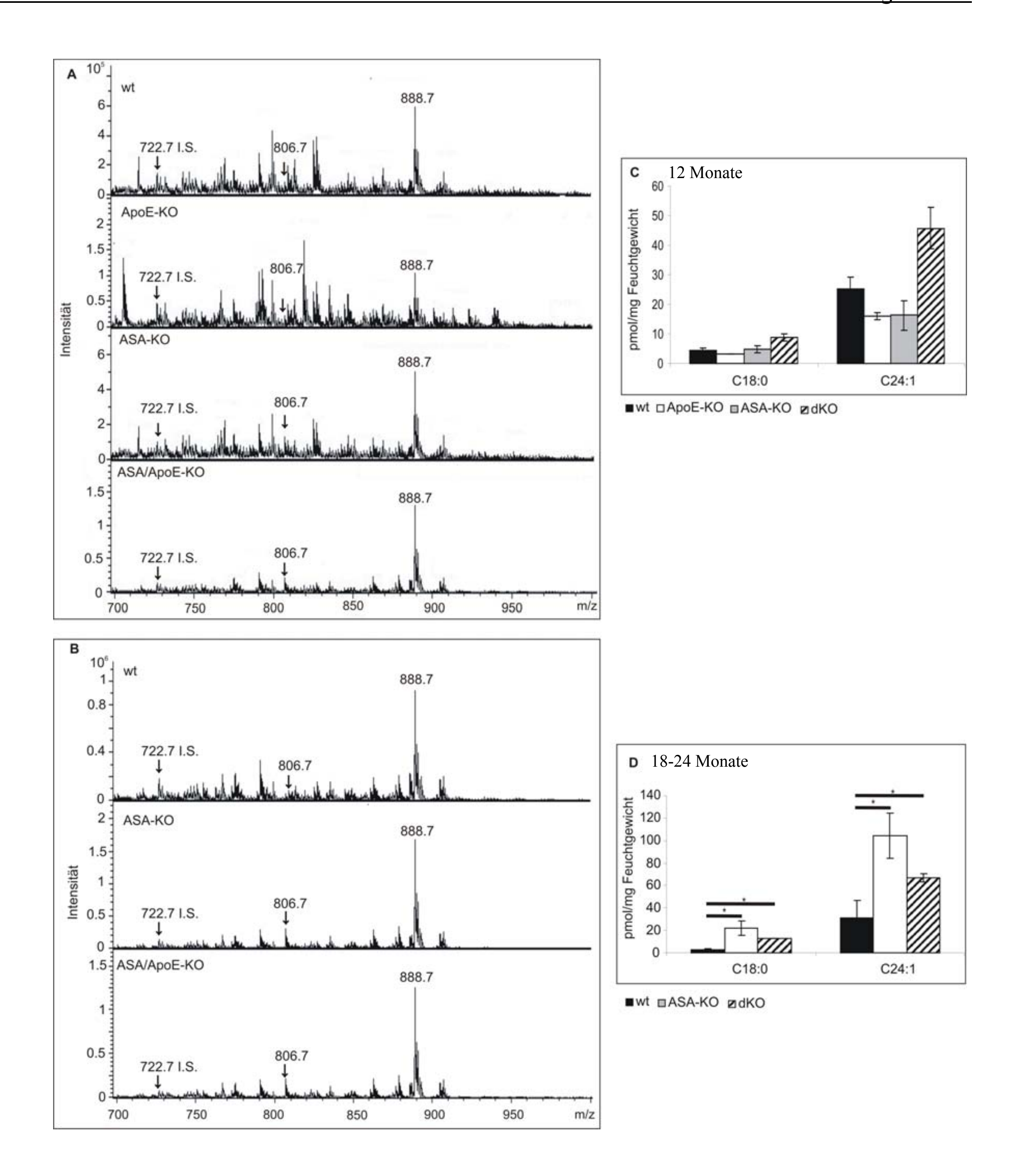


Abb. 3.4: Massenspektren und quantitative Auswertung der aus dem Gesamtgehirn isolierten Lipide. Lipide, die aus dem Gehirn ohne Cortex 12 und 18-24 Monate alter Mäuse isoliert wurden, wurden mittels einer ESI-Ionenfalle im negativen Ionenmodus auf ihre Sulfatid-Masse hin untersucht. Dargestellt sind die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse (m/z). Jeweils eine repräsentative Analyse von insgesamt drei unterschiedlichen Tieren pro Genotyp (n = 3) ist in A (12 Monate) und B (18-24 Monate) dargestellt. Die Zahlen zeigen die Massenpeaks der deprotonierten Sulfatide ($M\text{-}H^-$) entsprechend ihrer Fettsäurekette an. Der Peak 722.7 entspricht dem Sulfatid-Derivat C12:0, der als interner Standard (IS) eingesetzt wurde. Der Peak 806.7 m/z entspricht einem Sulfatid mit eineem C18:0-Fettsäurerest. Der Sulfatid-Derivat Peak 888.7 m/z entspricht einem C24:1-Fettsäurerest. C-D stellt die quantitative Auswertung des C18:0- und C24:1-kettigen Sulfatid-Gehalts des Cortex im Alter von 12 Monaten (C) und 18-24 Monaten (D) dar. Ein Stern zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied (T-Test, $p< 0.05$).

3.1.3 Histochemische und Immunfluoreszenz-Analysen der ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäuse:

Bei den biochemischen Untersuchungen der Lipide zur Aufklärung der Sulfatidspezies fielen Unterschiede in der Fettsäurekettenlänge und der Menge an Sulfatid zwischen ASA-, ASA/ApoE-Knockout- und Wildtyp- bzw. ApoE-Knockout-Mäusen auf. Ein erhöhter Wert von kurzkettigem C18:0-Sulfatid wurde in den ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Tieren gemessen. C18:0-Sulfatid ist hauptsächlich in Neuronen zu finden. Im Folgenden wurde versucht, diese Anreicherung von C18:0-Sulfatid in Neuronen histologisch nachzuweisen.

3.1.3.1 Untersuchung der Sulfatid-Akkumulation in Neuronen im Kleinhirn, Cortex und im Stammhirn

Mit Hilfe des Farbstoffes Alcianblau lässt sich beispielsweise an Gehirnschnitten von Mäusen Sulfatid-Akkumulation nachweisen. In den ASA- und in ASA/ApoE-Knockout-Mäusen könnte so histologisch die Akkumulation von Sulfatid in Oligodendrozyten und auch in Neuronen gezeigt werden (Wittke et al., 2004).

Um die genaue, zelluläre Lokalisation von Sulfatid speziell in den Neuronen zu untersuchen, wurde eine Alcianblaufärbung zusammen mit einem neuronalen Marker, HRP-3 (Hepatoma derived growth factor related protein-3) und NeuN (neuronal nuclei) durchgeführt. Es sollte vor allem geklärt werden, ob die ApoE-Defizienz in den Doppel-Knockout-Tieren einen Einfluss auf neuronale Sulfatid-Speicherung hat. Da bereits gezeigt worden war, dass eine verstärkte Sulfatid-Akkumulation in den Bereichen des Cortex, Kleinhirns und Stammhirns zu erkennen ist, konzentrierten sich die Analysen auf diese Bereiche. Für die Analyse wurden Tiere im Alter von 12 und 18-24 Monaten untersucht. Für die Alcianblaufärbung und die im Anschluss folgende immunhistochemische Färbung mit den neuronalen Markern HRP-3 bzw. NeuN wurden 12-14 µm dicke Kryoschnitte des Gehirns verwendet. HRP-3 wird im Nervensystem stark exprimiert und ist in den meisten Neuronen im *Nucleus* lokalisiert (El-Tahir et al., 2009). Um die Gesamtheit der Neuronen zu markieren, wurde mit NeuN eine weitere Analyse durchgeführt. Es wurden jeweils Schnitte des gleichen Bereiches verwendet, um die gezeigten Regionen vergleichen zu können. Als negative Kontrollgewebe wurden hierbei Gehirnschnitte von Wildtyp- und ApoE-Knockout-Tieren verwendet, da diese keine Sulfatid-Akkumulation zeigen. In den Abbildungen 3.6-3.11 sind beispielhaft die Ergebnisse der unterschiedlichen Färbungen, Alcianblau in Kombination mit HRP-3 (Abb. 3.5-3.7) und Alcianblau mit NeuN (Abb. 3.8-3.10) jeweils für die Gehirnbereiche Kleinhirn, Cortex und

Stammhirn gezeigt. Das HRP-3- bzw. NeuN-Signal ist braun gefärbt, die Sulfatid-Speicherung blau.

Schon im Alter von einem Jahr war in den verschiedenen Gehirn-Bereichen, wie Medulla, Cortex sowie in den Nuclei des Vorder- und Mittelhirn eine Sulfatid-Speicherung zu finden, wobei jedoch nach 18-24 Monaten in der weißen wie auch in der grauen Substanz eine intensivere Alcianblaufärbung zu sehen war.

Es konnte bei keinem untersuchten Alter im Kleinhirn eine spezifische Sulfatidfärbung in den Neuronen oder in den Purkinje-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.5, 3.6). Im Cortex konnte jedoch schon bei einjährigen ASA-Knockout-Mäusen und auch bei den Doppel-Knockout-Tieren eine schwache Anreicherung von Sulfatid in Neuronen beobachtet werden. Im Alter von zwei Jahren wurde im Cortex eine verstärkte Anfärbung von Sulfatid in den Neuronen gefunden (Abb. 3.6, 3.9). Ebenso trat eine zunehmende Speicherung an Sulfatid im Stammhirn auf. In den Neuronen war in der Medulla oblongata im Bereich des preposilus nucleus und dorsal paragigantocellular nucleus vor allem bei den älteren Tieren von zwei Jahren eine vermehrte Co-Färbung von Alcianblau und HRP-3 bzw. NeuN präsent (Abb. 3.7, 3.10). Bei den jüngeren Tieren war nur eine leichte Sulfatid-Akkumulation nachweisbar (Abb. 3.7, 3.10). Die Daten zeigen deutlich, dass in den Neuronen von ASA-Knockout-Mäusen wie auch ASA/ApoE-Knockout-Tieren Sulfatid gespeichert wurde. Neben den Alcianblau-positiven Neuronen sind weitere Zellen mit Alcianblau gefärbt, diese wurden bereits in früheren Studien als Oligodendrozyten und Phagozyten identifiziert (Wittke et al., 2004).

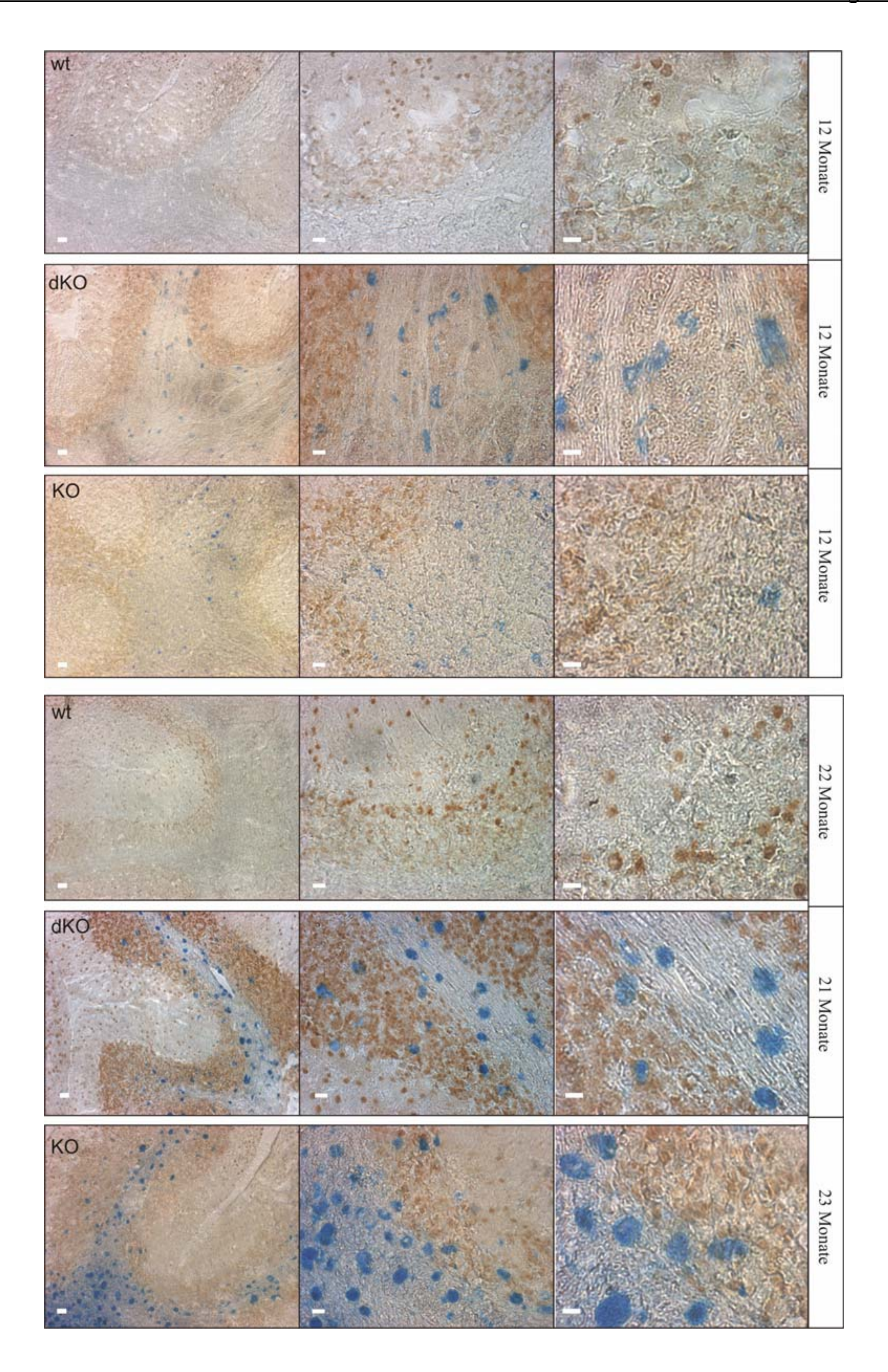


Abb. 3.5: Alcianblaufärbung in Kombination mit dem neuronalen Marker HRP-3 im Kleinhirn.

Dargestellt sind 12-14 µm dicke Gehirnschnitte von Wildtyp- (wt), ASA-Knockout- (KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen (dKO), die doppelt gefärbt wurden mit Alcianblau (blau) und HRP-3 (braun), das als neuronaler Marker (braun) eingesetzt worden ist. Es handelt sich immer um dieselbe Region in drei verschiedenen Vergrößerungen. HRP-3 (1:100) wurde mittels Peroxidase sichtbar gemacht. Maßstabsbalken: 50 µm.

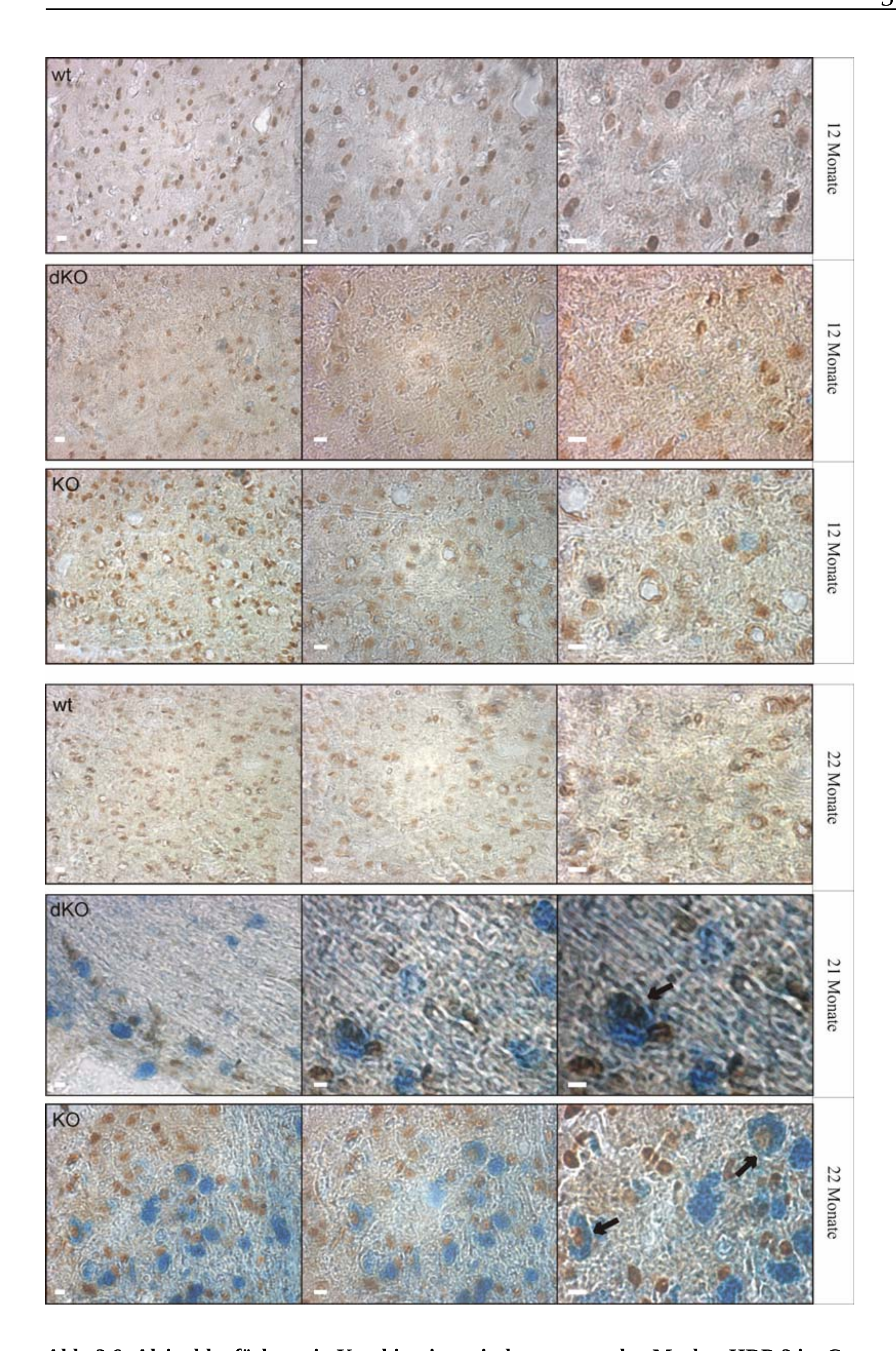


Abb. 3.6: Alcianblaufärbung in Kombination mit dem neuronalen Marker HRP-3 im Cortex.

Dargestellt sind 12-14 µm dicke Gehirnschnitte von Wildtyp- (wt) , ASA-Knockout- (KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen (dKO) die doppelt gefärbt wurden mit Alcianblau (blau) und HRP-3 (braun), das als neuronaler Marker (braun) eingesetzt worden ist. Es handelt sich immer um dieselbe Region in drei verschiedenen Vergrößerungen. HRP-3 (1:100) wurde mittels Peroxidase sichtbar gemacht. Maßstabsbalken: 50 µm. Die Pfeile markieren Neuronen mit akkumulierten Sulfatid.

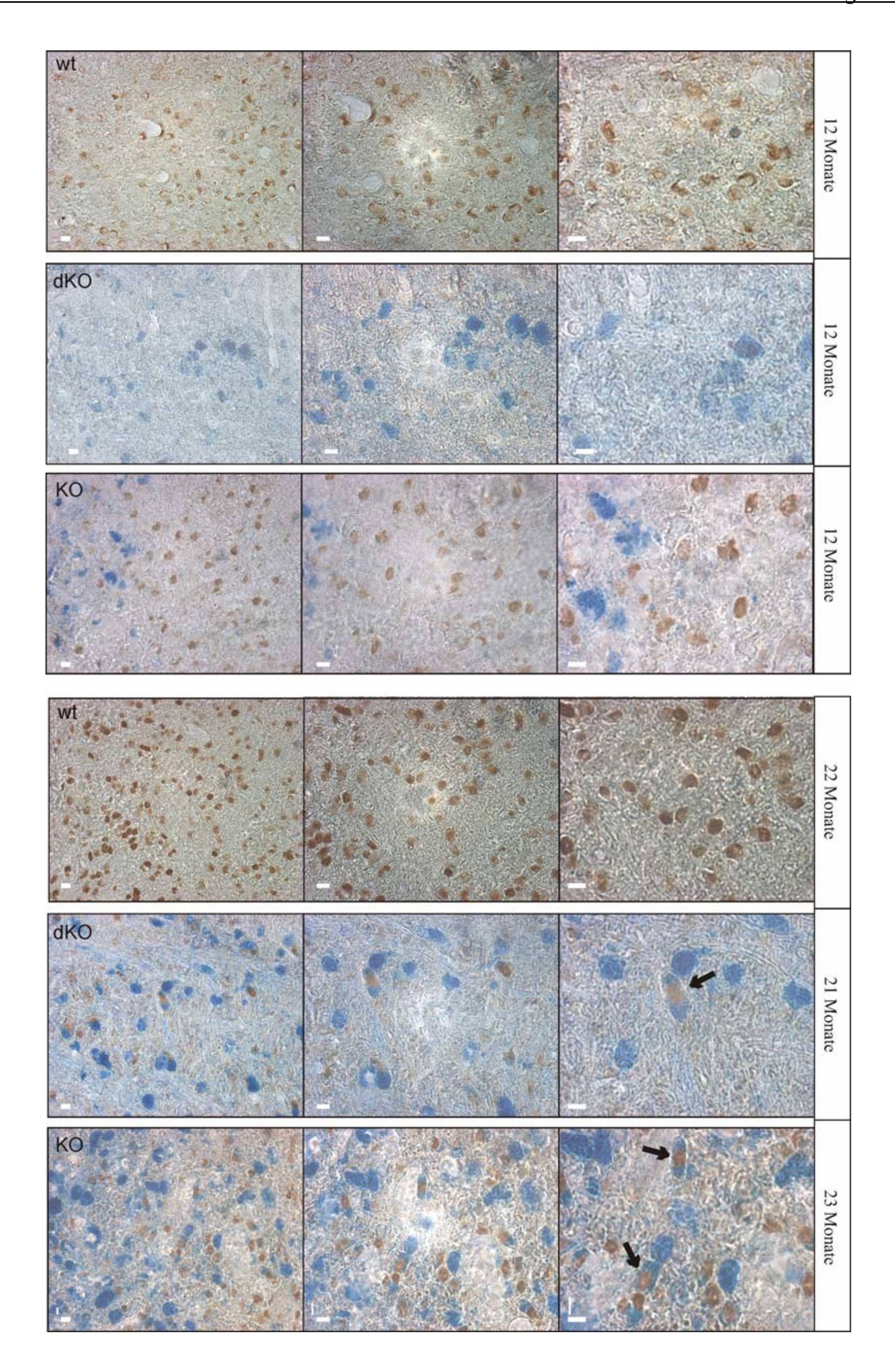


Abb. 3.7: Alcianblaufärbung in Kombination mit dem neuronalen Marker HRP-3 im Stammhirn.

Dargestellt sind 12-14 µm dicke Gehirnschnitte von Wildtyp-(wt), ASA-Knockout- (KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen (dKO), die doppelt gefärbt wurden mit Alcianblau (blau) und HRP-3 (braun), das als neuronaler Marker (braun) eingesetzt worden ist. Der Ausschnitt des gewählten Abbildungsbereiches zeigt die Gehirn-Sektion der Medulla oblongata. Es handelt sich immer um dieselbe Region in drei verschiedenen Vergrößerungen. HRP-3 (1:100) wurde mittels Peroxidase sichtbar gemacht. Maßstabsbalken: 50 µm.

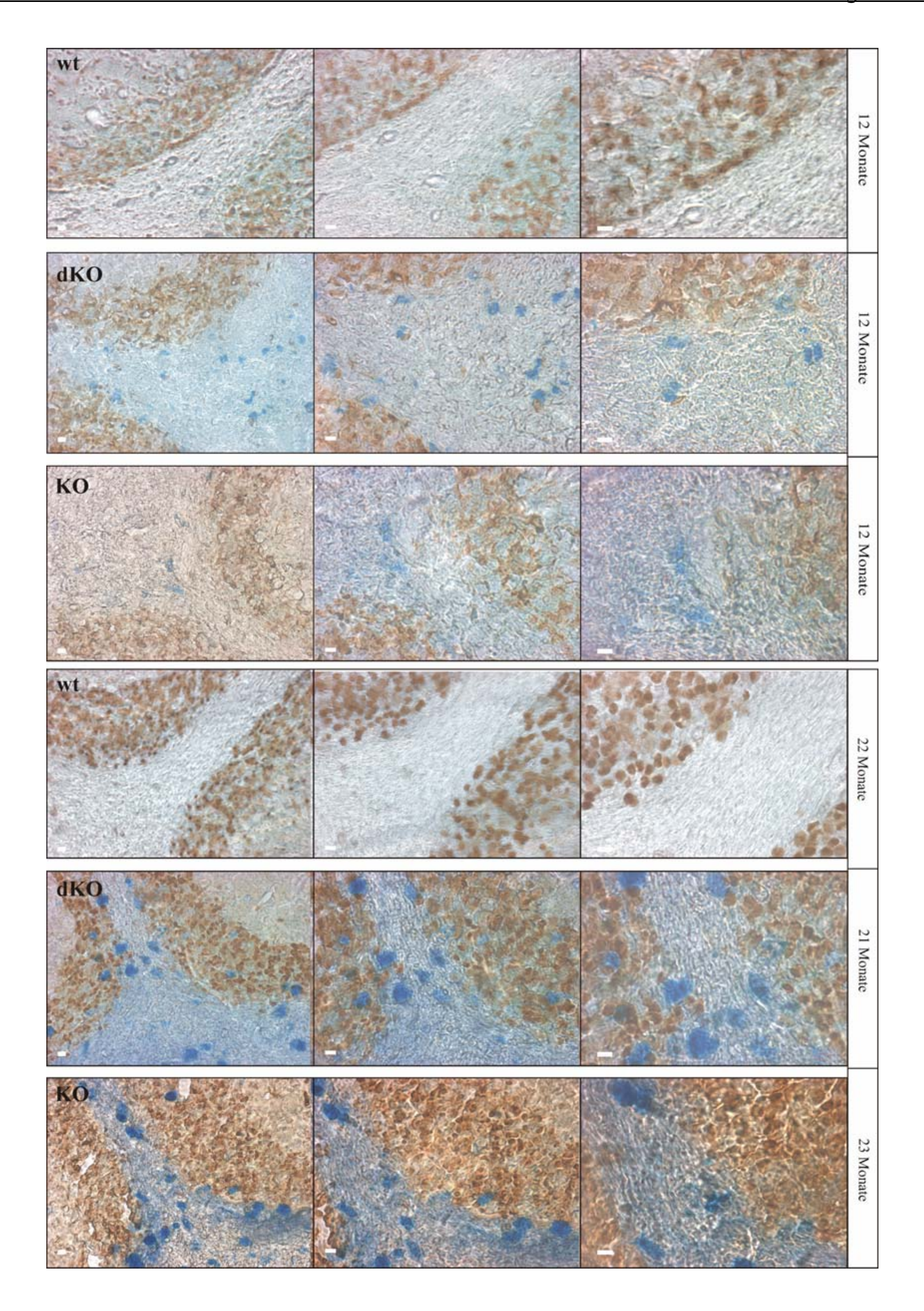


Abb. 3.8: Alcianblaufärbung in Kombination mit dem neuronalen Marker NeuN im Kleinhirn.

Dargestellt sind 12-14 µm dicke Gehirnschnitte von Wildtyp-(wt), ASA-Knockout- (KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen (dKO), die doppelt gefärbt wurden mit Alcianblau (blau) und NeuN (braun), das als neuronaler Marker (braun) eingesetzt worden ist. Der Ausschnitt des gewählten Abbildungsbereiches zeigt die Gehirn-Sektion des Kleinhirns. Es handelt sich immer um dieselbe Region in drei verschiedenen Vergrößerungen. Neu-N (1:500) wurde mittels Peroxidase sichtbar gemacht. Maßstabsbalken: 50 µm.

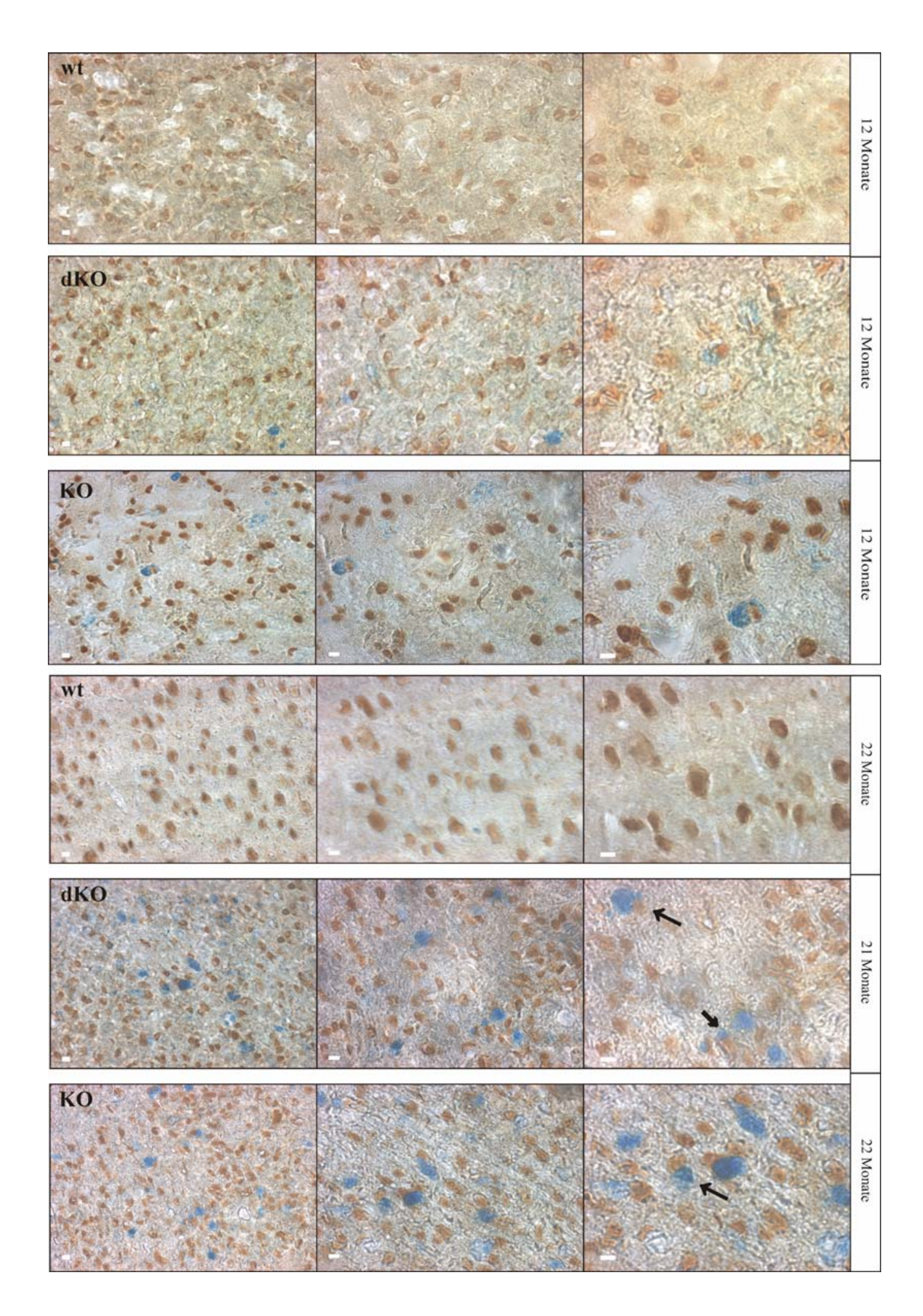


Abb. 3.9: Alcianblaufärbung in Kombination mit dem neuronalen Marker NeuN im Cortex.

Dargestellt sind 12-14 µm dicke Gehirnschnitte von Wildtyp-(wt), ASA-Knockout- (KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen (dKO), die doppelt gefärbt wurden mit Alcianblau (blau) und NeuN (braun), das als neuronaler Marker (braun) eingesetzt worden ist. Der Ausschnitt des gewählten Abbildungsbereiches zeigt die Gehirn-Sektion des Cortex. Es handelt sich immer um dieselbe Region in drei verschiedenen Vergrößerungen. Neu-N (1:500) wurde mittels Peroxidase sichtbar gemacht Maßstabsbalken: 50 µm. Pfeile zeigen auf Neuronen mit angereicherten Sulfatid.

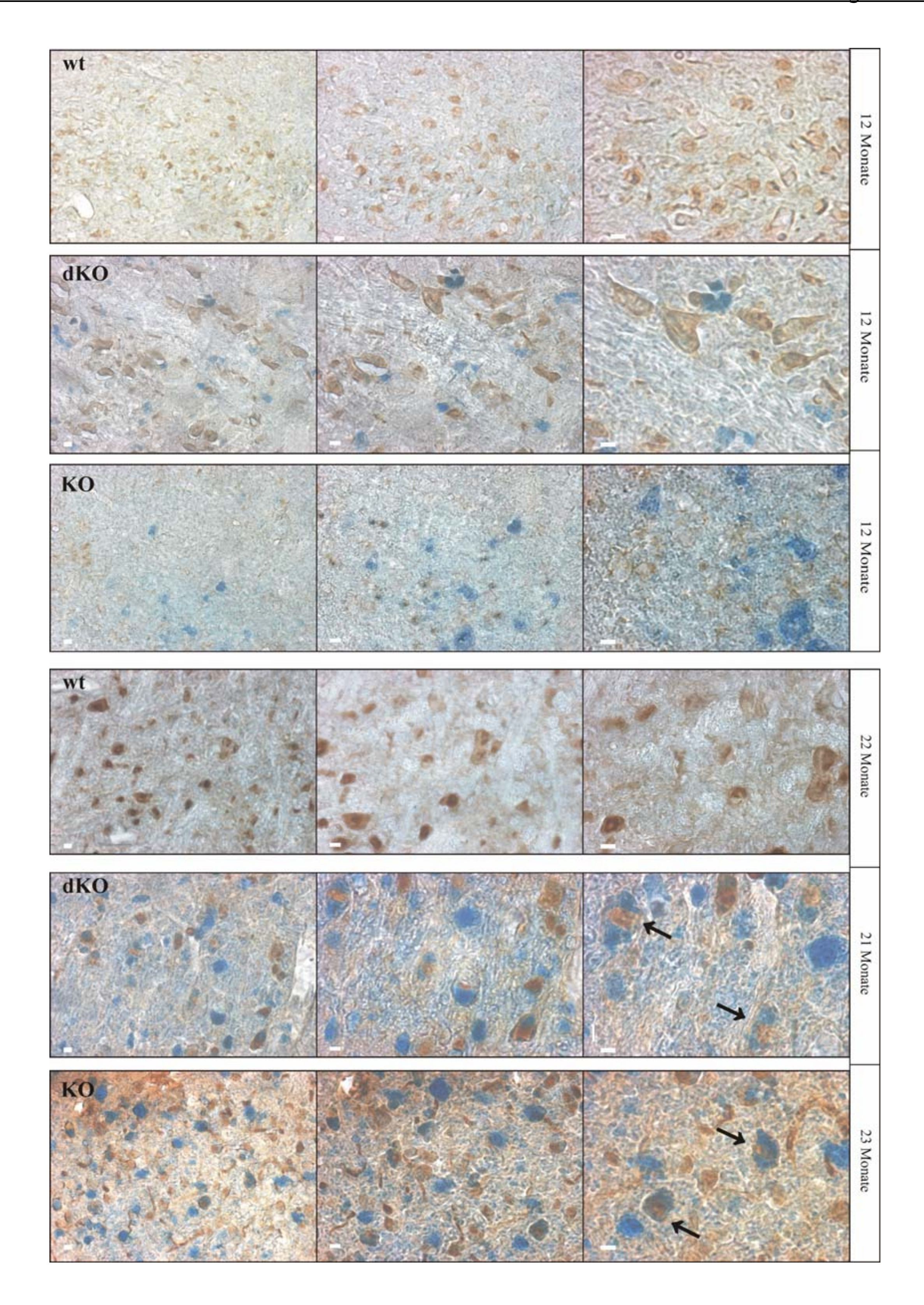


Abb. 3.10: Alcianblaufärbung in Kombination mit dem neuronalen Marker NeuN im Stammhirn.
Dargestellt sind 12-14 µm dicke Gehirnschnitte von Wildtyp-(wt), ASA-Knockout- (KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen (dKO), die doppelt gefärbt wurden mit Alcianblau (blau) und NeuN (braun), das als neuronaler Marker (braun) eingesetzt worden ist. Der Ausschnitt des gewählten Abbildungs-Bereiches zeigt die Gehirn-Sektion der Medulla oblongata. Es handelt sich immer um dieselbe Region in drei verschiedenen Vergrößerungen. Neu-N (1:500) wurde mittels Peroxidase sichtbar gemacht Maßstabsbalken: 50 µm. Pfeile zeigen auf Neuronen mit angereicherten Sulfatid.

3.1.3.2 Immunfluoreszenz Analyse der Sulfatid-Akkumulation in Neuronen im Cortex und im Stammhirn

Mit der Immunfärbung sollte mit Hilfe des spezifischen Sulfatid-Antikörpers SulphI (Fredman, 1988) untersucht werden, ob die Neuronen bei den ASA-Knockout- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen Sulfatid-Speicherung aufweisen. Wie bereits in der Co-Färbung von Alcianblau und den neuronalen Markern HRP-3 und NeuN zu sehen ist, speichern die Neuronen teilweise Sulfatid. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser zwei Nachweismethoden sollte eine verlässliche Aussage über die Lokalisation der Sulfatid-Speicherung im Gehirn zulassen. Eine spezifische Markierung von neuronalen Zellen wurde durch die Auswahl verschiedener Marker gewährleistet. Für die Co-Färbung mit dem Antikörper SulphI wurden die neuronalen Marker HRP-3, NSE (Neuronen spezifische Enolase) und ß-III-Tubulin ausgewählt. Für die folgende Analyse wurden Kryoschnitte des Gehirns von 12 und 18-24 Monate alten Mäusen mit Immunfluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. Je Alter und Genotyp wurden dafür jeweils Schnitte von mindestens drei Tieren untersucht.

Sowohl bei den ASA- wie auch bei den ASA/ApoE-Knockout-Mäusen wurden in den HRP-3 positiven Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp- und den ApoE-Knockout-Mäusen eine verstärkte Sulfatid-Anreicherung gefunden (Abb. 3.11). Die Sulfatid-Anreicherung wurde mit dem SulphI-Antikörper (rot) nachgewiesen, während eine Co-Färbung mit dem neuronalen Marker HRP-3 (Abb. 3.11) bzw. NSE (Abb. 3.13, 3.15) und ß-III-Tubulin (Abb. 3.12, 3.14) mit einem grün fluoreszierenden Zweitantikörper markiert wurde. In den Bereichen des Cortex und der Medulla oblangata konnte bereits im Alter von einem Jahr eine beginnende Sulfatid-Akkumulation in den Neuronen beobachtet werden. Mit zunehmendem Alter verstärkt sich diese Akkumulation.

Im oberen Teil der Abbildung 3.11 A sind die Aufnahmen von einjährigen Tieren gezeigt. Sulfatid und HRP-3 sind bei den ASA-Knockout-Mäusen und bei den ASA/ApoE-Knockout-Mäusen nicht co-lokalisiert. Die Abbildung 3.11 B. zeigt HRP-3 positive Zellen mit zytoplasmatischem Sulfatid. Diese Beobachtungen sind auch bei den anderen beiden neuronalen Markern zu finden. So ist eine deutliche Co-Lokalisation von SulphI und ß-III-Tubulin und SulphI und NSE bei den Mäusen im Alter von 18-24 Monaten in den Abbildungen 3.12 B und 3.13 B vorhanden.

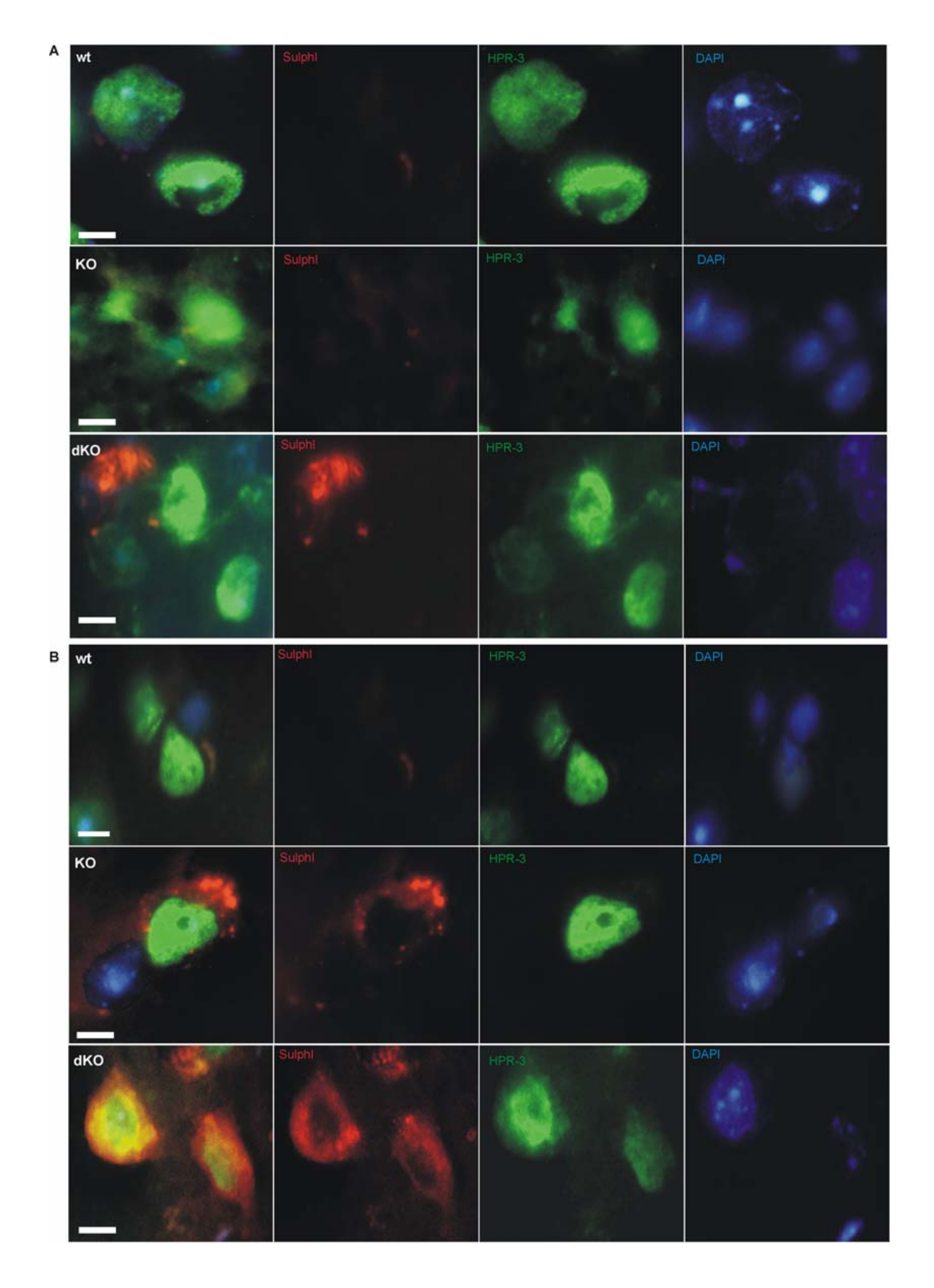


Abb. 3.11: Immunfluoreszenz-Analyse von Gewebeschnitten des Cortex mit dem neuronalen Marker HRP-3. Co-Färbung von 12-14 µm dicke Kryoschnitten mit SulphI (rot; 1:500) und HRP-3 (grün, 1:100). Die Überlagerung der einzelnen Bilder mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung (1:500) ist auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt. A zeigt Färbungen von Gehirnschnitten von einem Jahr alten Tieren und in B ist die Färbung an Gehirnschnitten von 18-24 Monaten alten Mäusen dargestellt. Repräsentativ ist je ein Schnitt für jeden Genotyp abgebildet. Maßstabsbalken: 10 µm; von Wildtyp-(wt), ASA- (KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäuse (dKO).

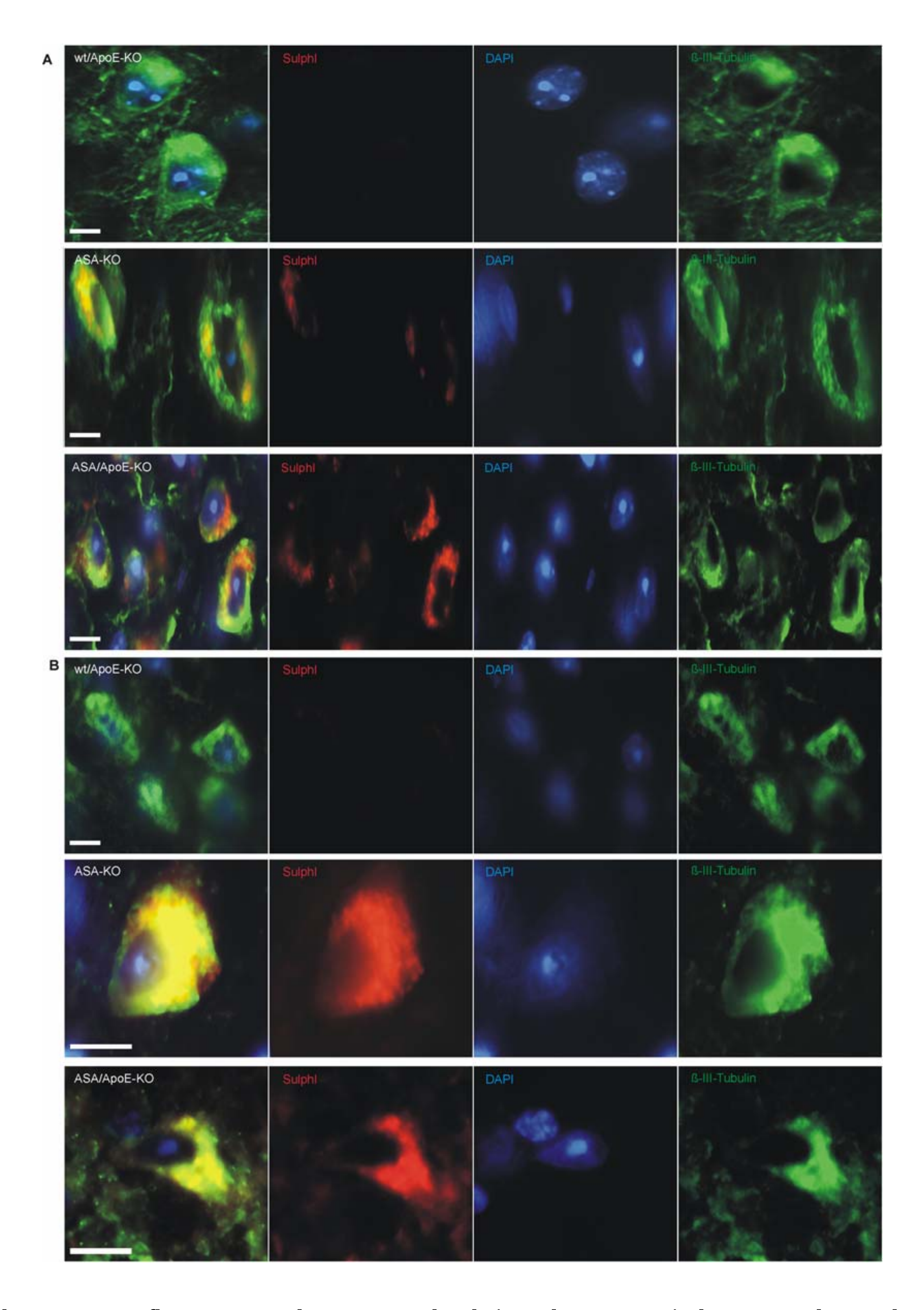


Abb. 3.12: Immunfluoreszenz-Analyse von Gewebeschnitten des Cortex mit dem neuronalen Marker ß-III-Tubulin. Co-Färbung von 12-14 µm dicken Kryoschnitten mit SulphI (rot, 1:500) und ß-III-Tubulin (grün, 1:500)**.** Die Überlagerung der einzelnen Bilder mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung (1:500) ist auf der linken Seite der Abbildung dargestellt. A zeigt Färbungen von Gehirnschnitten von einem Jahr alten Tieren und in B ist die Färbung an Gehirnschnitten von 18-24 Monate alten Mäusen dargestellt. Repräsentativ ist je ein Schnitt für jeden Genotyp abgebildet. Maßstabsbalken: 10 µm; Wildtyp- (wt), ASA-Knockout- (ASA-KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäuse (ASA/ApoE KO).

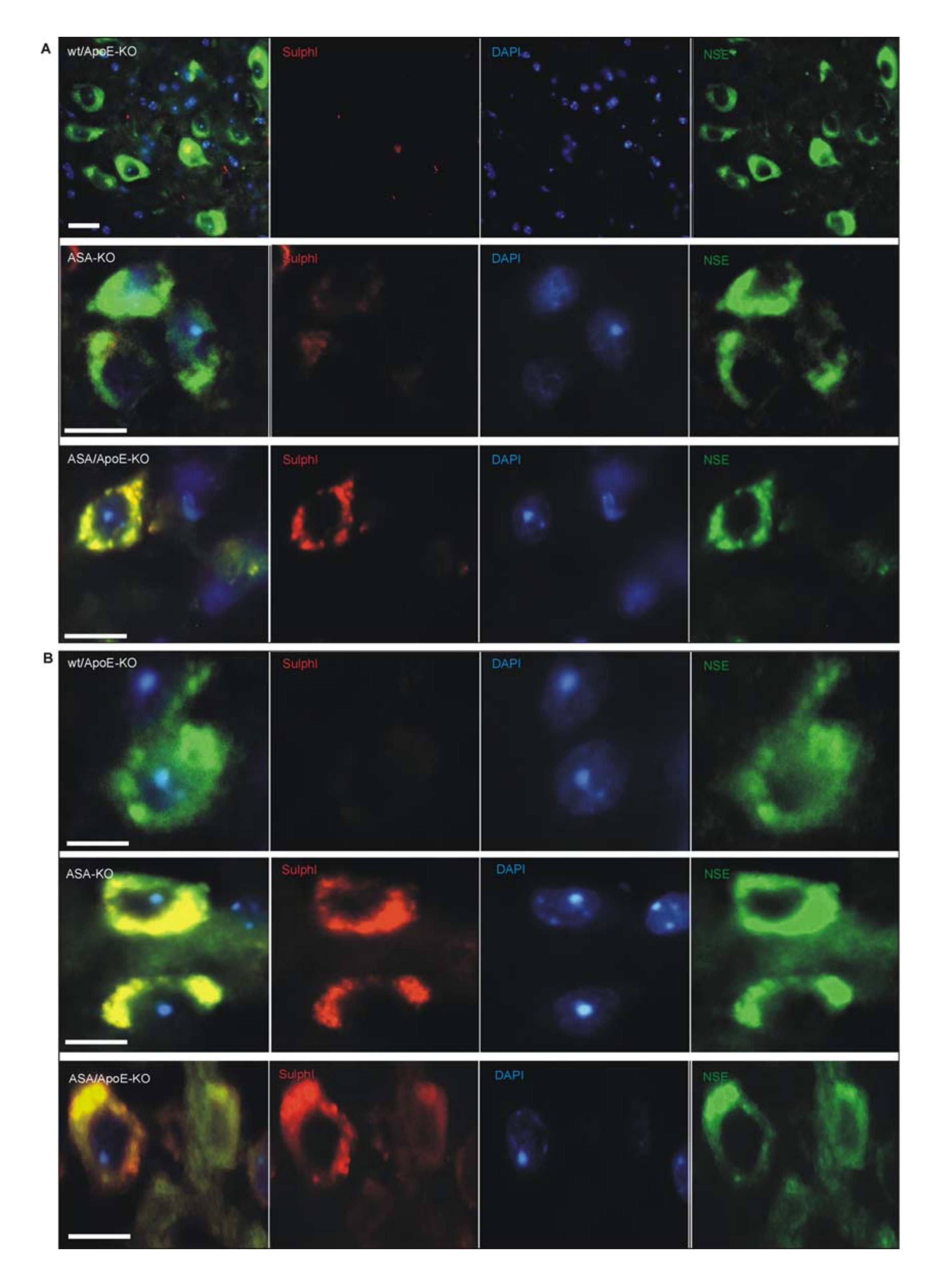


Abb. 3.13: Immunfluoreszenz-Analyse von Gewebeschnitten des Cortex mit dem neuronalen Marker NSE. Co-Färbung von 12-14 µm dicken Kryoschnitten mit SulphI (rot, 1:500) und NSE (grün, 1:100). Die Überlagerung der einzelnen Bilder mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung (1:500) ist auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt. A zeigt Färbungen von Gehirnschnitten von einem Jahr alten Tieren und in B ist die Färbung an Gehirnschnitten von 18-24 Monate alten Mäusen dargestellt. Repräsentativ ist je ein Schnitt für jeden Genotyp abgebildet. Maßstabsbalken: 10 µm. Wildtyp- (wt), ASA-Knockout- (ASA-KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäuse (ASA/ApoE KO).

Besonders im Bereich der Mendulla oblangata waren viele mit Sulfatid angereicherte Neuronen zu finden. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.14 im Vergleich zu ß-III-Tubulin und in 3.15 zu NSE dargestellt. Auch hier zeigte sich zunächst nur eine partielle Sulfatid-Anreicherung in Neuronen bei den einjährigen Mäusen, die sich aber mit zunehmendem Alter wesentlich verstärkte. Eine klar erkennbare Co-Lokalisation von SulphI mit dem jeweiligen neuronalen Marker, ß-III-Tubulin und NSE war zu beobachten (Abb. 3.14 B, 3.15 B).

Diese Immunfluoreszens-Aufnahmen zeigen deutlich, dass bei den ASA-Knockout- und den ASA/ApoE-Knockout-Mäusen eine Sulfatid-Speicherung in den Neuronen vorhanden ist, und dass die ApoE-Defizienz keinen merklichen Effekt auf die Sulfatid-Akkumulation hat.

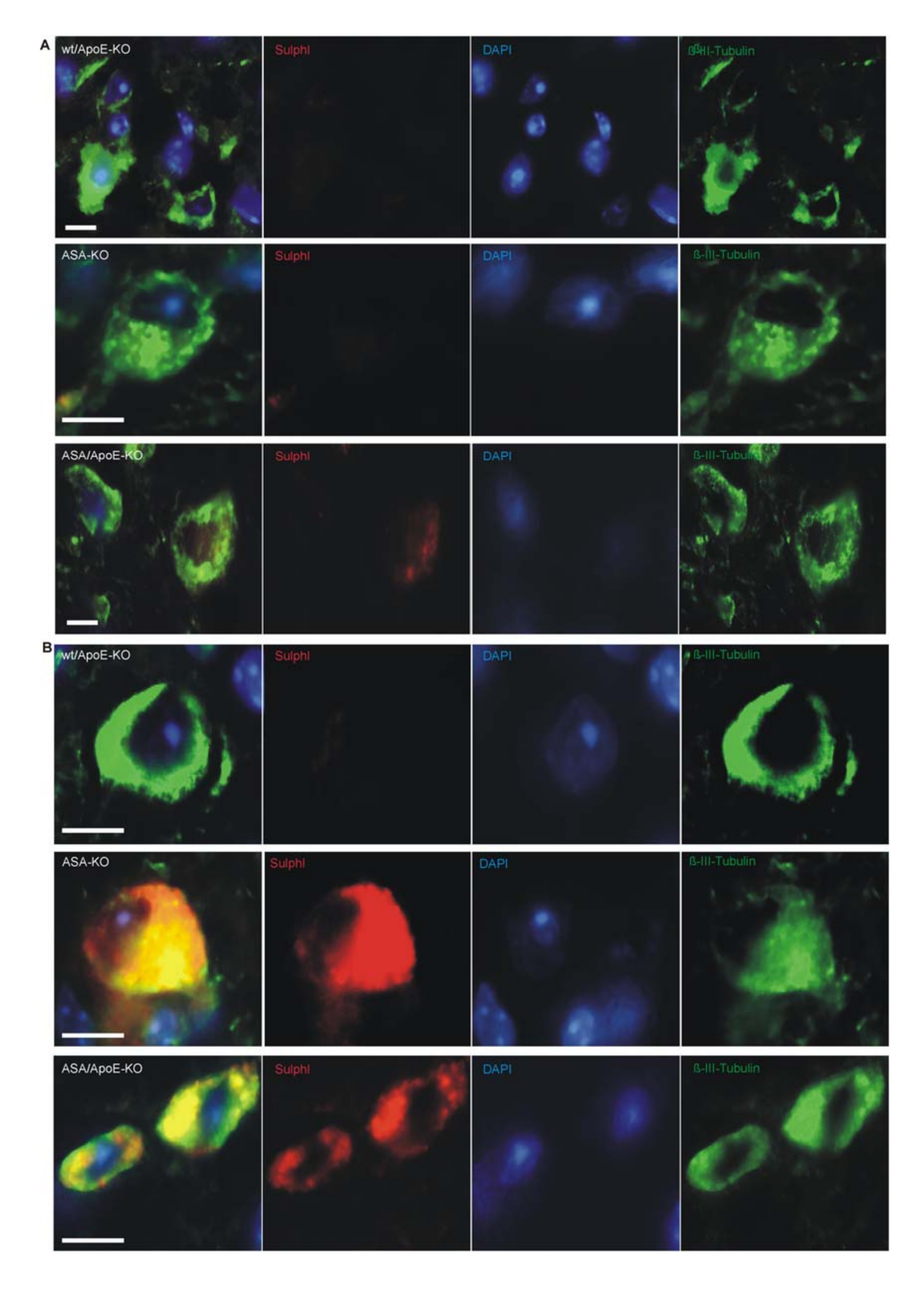


Abb. 3.14: Immunfluoreszenz-Analyse von Gewebeschnitten der Medulla oblangata mit dem neuronalen Marker ß-III-Tubulin. Co-Färbung von 12-14µm dicken Kryoschnitten mit SulphI (rot, 1:500) und ß-III-Tubulin (grün, 1:500). Die Überlagerung der einzelnen Bilder mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung (1:500) ist auf der linken Seite der Abbildung dargestellt. A zeigt Färbungen von Gehirnschnitten von einem Jahr alten Tieren und in B ist die Färbung an Gehirnschnitten von 18-24 Monate alten Mäusen dargestellt. Repräsentativ ist je ein Schnitt für jeden Genotyp abgebildet. Maßstabsbalken: 10 µm. Wildtyp- (wt), ASA-Knockout- (ASA-KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäuse (ASA/ApoE KO).

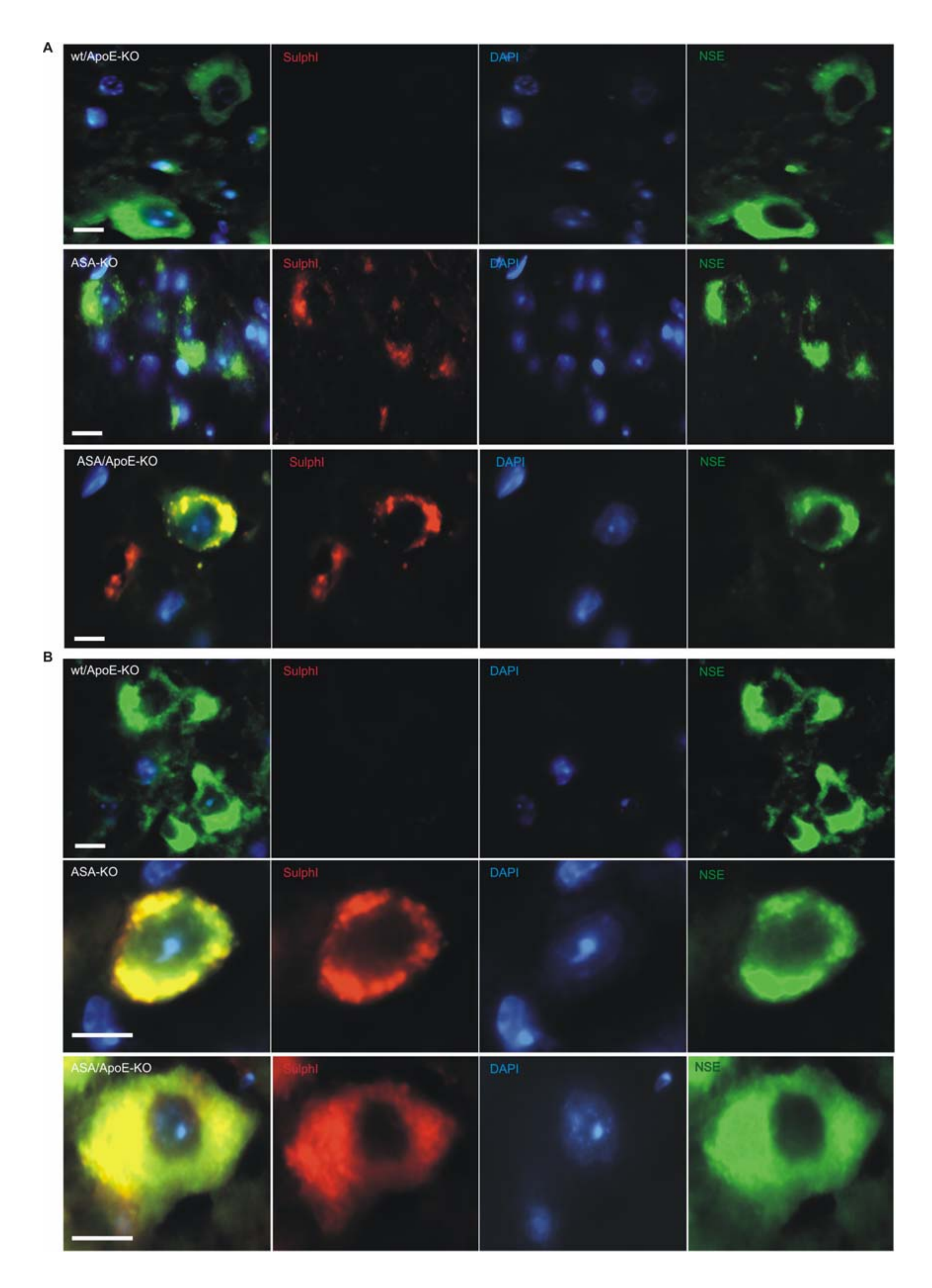


Abb. 3.15: Immunfluoreszenz-Analyse von Gewebeschnitten der Mendulla oblangata mit dem neuronalen Marker NSE. Co-Färbung von 12-14µm dicken Kryoschnitten mit SulphI (rot, 1:500) und NSE (grün, 1:100). Die Überlagerung der einzelnen Bilder mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung (1:500) ist auf der linken Seite der Abbildung dargestellt. A zeigt Färbungen von Gehirnschnitten von einem Jahr alten Tieren und in B ist die Färbung an Gehirnschnitten von 18-24 Monate alten Mäusen dargestellt. Repräsentativ ist je ein Schnitt für jeden Genotyp abgebildet. Maßstabsbalken: 10 µm. Wildtyp- (wt), ASA-Knockout- (ASA-KO) und ASA/ApoE-Knockout-Mäuse (ASA/ApoE KO).

3.2.4 Lipidanalyse und Vergleich der beiden ASA-Knockout-Stämme C57BL/6 und 129/Ola

Zur Untersuchung der MLD wurde ein Mausmodell erzeugt, in dem eine ASA-Defizienz vorhanden ist. Hierbei wurden verschiedene Mausstämme, die unterschiedliche Hintergründe haben, verwendet. In dieser Arbeit wurden die beiden ASA-Knockout Stämme mit dem Hintergrund C57BL/6 und 129/Ola untersucht. Es sollte untersucht werden, ob der genetische Hintergrund einen Effekt auf das Ausmaß der Sulfatid-Speicherung hat. Dazu wurden die Lipide des Gehirns und der Niere von einem Jahr und zwei Jahre alten Tieren analysiert. Für die Untersuchung der Lipide wurden je Altersstufe und Hintergrund drei verschiedene Tiere herangezogen.

In den Abbildungen 3.16 A-D sind die Ergebnisse für das Gehirn und in 3.17 A-D die Ergebnisse für die Niere dargestellt. Im Gehirn zeigte sich bereits nach dem ersten Lebensjahr ein erhöhter Sulfatid-Gehalt in den C57BL/6- und 129/Ola Knockout-Mäusen. Bei den ASA-Knockout-Mäusen mit C57BL/6- und 129/Ola-Hintergrund war schon im Alter von einem Jahr ein signifikanter Anstieg festzustellen (Abb. 3.16 A-B). Im Alter von zwei Jahren war bei beiden ASA-Knockout-Stämmen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen im Sulfatidgehalt zu beobachten. Deutlich ist eine verstärkte Sulfatid-Bande in der TLC (Abb. 3.16 B) bei den ASA-Knockout-Tieren zu sehen. Allerdings liegt zwischen den beiden ASA-Knockout Stämmen kein signifikanter Unterschied vor. Der unterschiedliche Hintergrund hat keinen Einfluss auf die Sulfatid-Menge.

Im Falle der Niere zeigte sich ein ähnliches Bild. Allerdings war zuerst im Alter von einem Jahr nur bei den C57BL/6 ASA-Knockout-Mäusen eine gesteigerte Sulfatid-Menge zu finden. Dies zeigte sich auch in den TLC-Analysen. Die Sulfatid-Banden sind wesentlich stärker bei den Knockout-Tieren als bei den Wildtyp-Tieren (3.17-B). Die Quantifizierung zeigte, dass bei beiden ASA-Stämmen ein signifikant erhöhter Anstieg an Sulfatid erst nach zwei Jahren festzustellen (Abb. 3.16 D) war.

Eine Anreicherung an Sulfatid zeigte sich bei den C57BL/6 – und bei den 129/Ola-Tieren schon im Alter von einem Jahr. Allerdings konnte zwischen den beiden Stämmen auch in der Niere kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, so dass auch hier der genetische Hintergrund keinen Einfluss auf den Sulfatid-Gehalt hat.

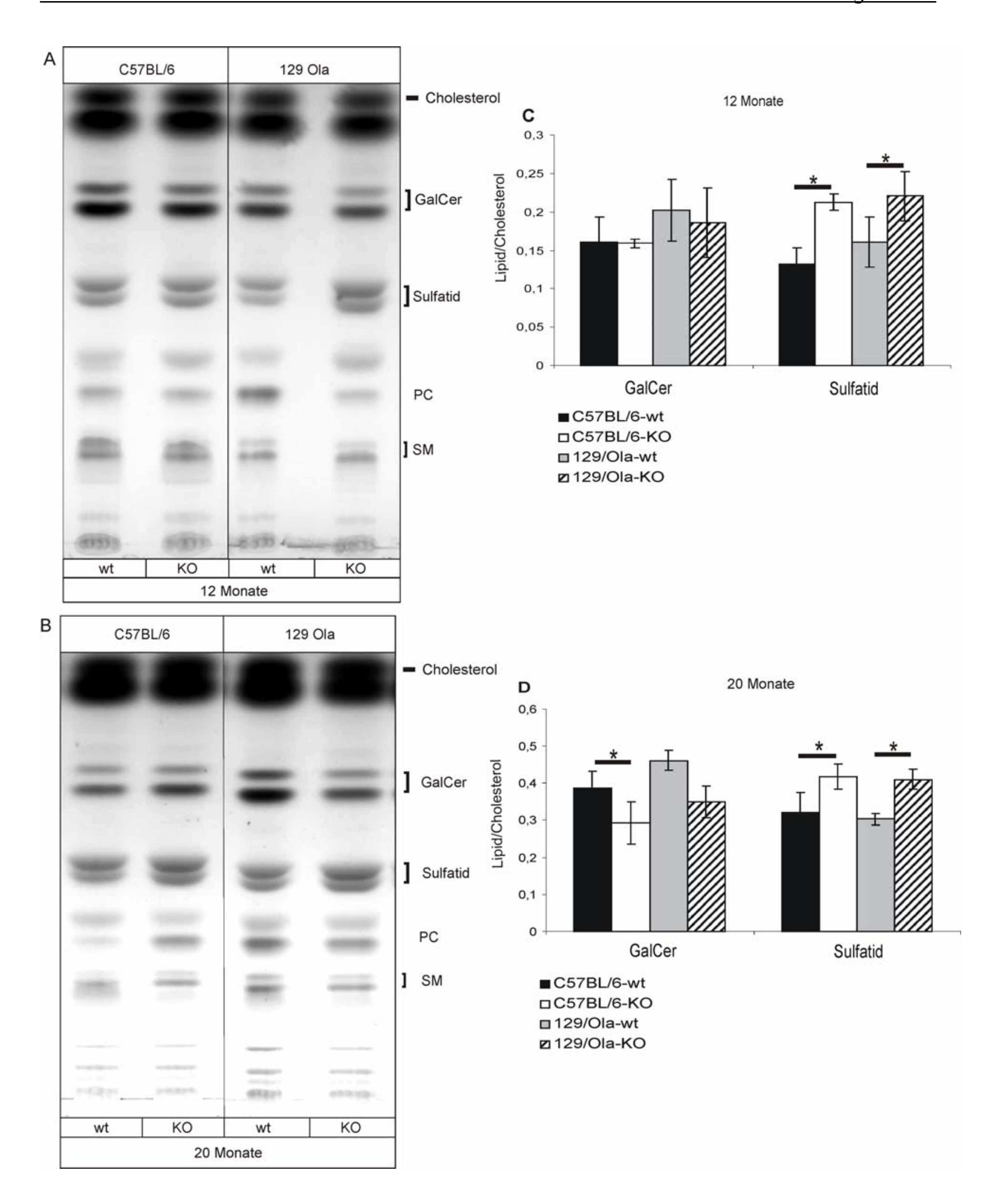


Abb. 3.16: Analyse und Quantifizierung der Lipide des Gehirns von 12 und 20 Monate alten C57BL/6 und 129/Ola Mäusen. Die Lipide wurden auf eine HPTLC Kieselgel 60 Platte aufgetragen und stellen je Genotyp ein repräsentatives Beispiel der Lipidzusammensetzung dar. Insgesamt wurden je Genotyp n = 3 Tiere untersucht. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 65:25:4. C-D stellen die Quantifizierung der Sulfatid- und Sphingomyelin-Menge (normiert auf Cholesterol) der Gesamtlipide des Gehirns im Alter von einem Jahr (C) und 20 Monaten (D) dar. Ein Stern zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test, p<0.05). GalCer = Galaktosylceramid, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin.

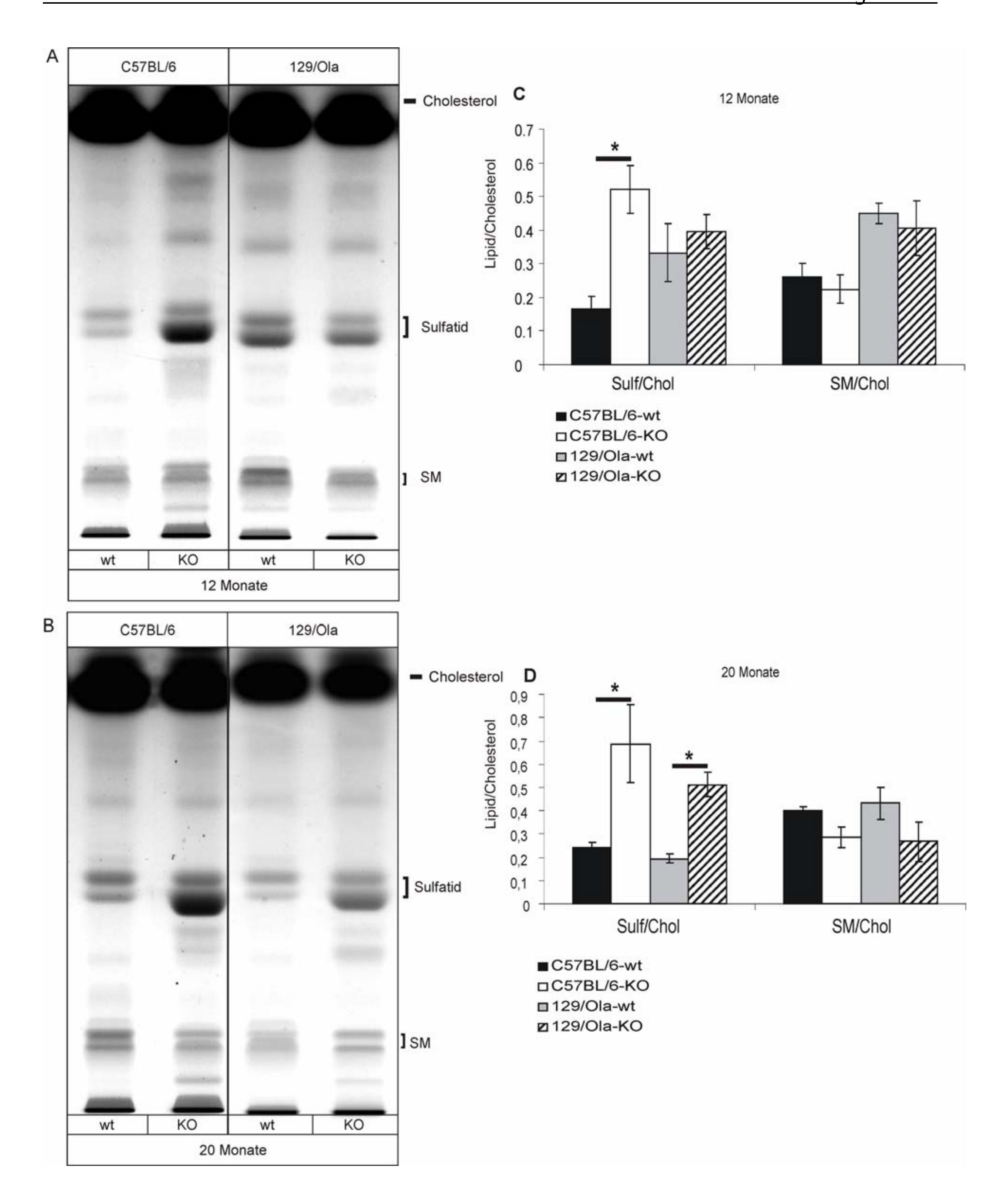


Abb. 3.17: Analyse und Quantifizierung der Lipide der Niere von 12 und 20 Monate alten C57BL/6 und 129/Ola. Die Lipide wurden auf eine HPTLC Kieselgel 60 Platte aufgetragen und stellen je Genotyp ein repräsentatives Beispiel der Lipidzusammensetzung dar. Insgesamt wurden je Genotyp n = 3 Tiere untersucht. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 65:25:4. C-D stellen die Quantifizierung der Sulfatid- und Sphingomyelin-Menge (normiert auf Cholesterol) der Gesamtlipide der Niere im Alter von einem Jahr (C) und 20 Monaten (D) dar. Ein Stern zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test, $p < 0.05$). GalCer = Galaktosylceramid, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin.

3.1.5 Zusammenfassung der Daten zu den biochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen an MLD-Mausmodellen

Anhand der Untersuchungen auf biochemischer und immunhistochemischer Ebene war festzustellen, dass die ASA/ApoE-Knockout-Mäuse eine verkürzte Lebensdauer im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen haben.
Mit Hilfe der ESI-MS-Analysen konnte ein erhöhter Gehalt an C18:0-Sulfatid im Cortex und im Gesamtgehirn bei den ASA-Knockout- und den ASA/ApoE-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden.
In den Neuronen des Cortex und der Medulla oblangata war in den Mäusen im Alter von zwei Jahren eine erhöhte Sulfatid-Anreicherung zu finden. Dies wurde mit Hilfe von Alcianblau-Färbung in Kombination mit einem neuronalen Marker nachgewiesen. Zusätzlich wurde dies mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Untersuchung bestätigt.
Der Vergleich von C57BL/6- und 129/Ola-ASA-Knockout-Mausstämmen ergab, dass die Tiere mit C57BL/6 und 129/Ola genetischen Hintergrund bereits nach einem Jahr einen erhöhten Sulfatid-Gehalt besitzen. Beide Knockout-Stämme zeigten ebenfalls im Alter von zwei Jahren einen signifikant erhöhten Sulfatid-Gehalt. Zwischen den beiden genetischen Hintergründen ist kein signifikanter Unterschied festzustellen.

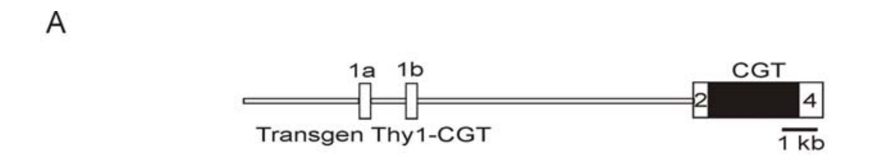
3.2 Transgene Thy-1-CGT-Mäuse: Analyse der letalen audiogenen Anfälle bei transgenen Mäusen, die einen erhöhten Sulfatid-Gehalt in Neuronen aufweisen

Dieser Abschnitt beinhaltet die Analyse eines transgenen Mausmodells, den Thy1-CGT. Ein wichtiges Enzym des Sulfatid-Anabolismus ist das Protein Ceramidgalaktosyltransferase (CGT), welches im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Die Überexpression von CGT in den Neuronen (mittels des Promotors Thy-1) in den transgenen CGT/ASA-defizienten-Mäusen resultiert in einer selektiven Erhöhung des Sulfatid-Gehalts (Eckhardt, 2008). Das Auftreten von Sulfatid in Neuronen in ASA-Knockout-Mäusen konnte bereits durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich, dass die transgenen CGT-Mäuse sehr empfindlich gegenüber audiogenen Reizen sind. Nach einem relativ geringen Geräusch-Stimulus (Schlüsselklirren) zeigten sie letale audiogene Anfälle. Ob neuronales Sulfatid eine Rolle hierbei spielt, ist noch nicht geklärt.

3.2.1 Nachweis der CGT-Expression im Gehirn von Thy-1-CGT-Mäusen

In frühen Studien wurden ASA-defiziente Thy-1-CGT-Mäuse mit einem gemischten Hintergrund C57BL/6/129Ola analysiert (Eckhardt et al., 2007). In den folgenden Untersuchungen wurde sich hauptsächlich auf die Mäuse mit einem reinen Hintergrund C57BL/6 konzentriert. Hierzu wurden zwei unabhängige transgene Mauslinien, 4747 und 4743, analysiert. Für die folgenden Analysen wurden Kryoschnitte der Gehirne von 120 Tage alten Mäusen einer *in situ*-Hybridisierung mit der CGT-RNA-Sonde unterzogen.

Die Auswertung ergab, dass die Expression des CGT-Transgens in den verschiedenen Gehirn-Bereichen der Thy-1-CGT-Mäuse zu finden war. Die *In situ*-Hybridisierung zeigte durchweg die transgene Expression im Vorderhirn, im Stammhirn und im Rückenmark. Des Weiteren konnte auch im Hippocampus, im Cortex und im Colliculus inferior (CI) eine transgene Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.18 B). Die transgene Linie 4743 zeigte insgesamt eine stärkere CGT-Expression als die Linie 4747.



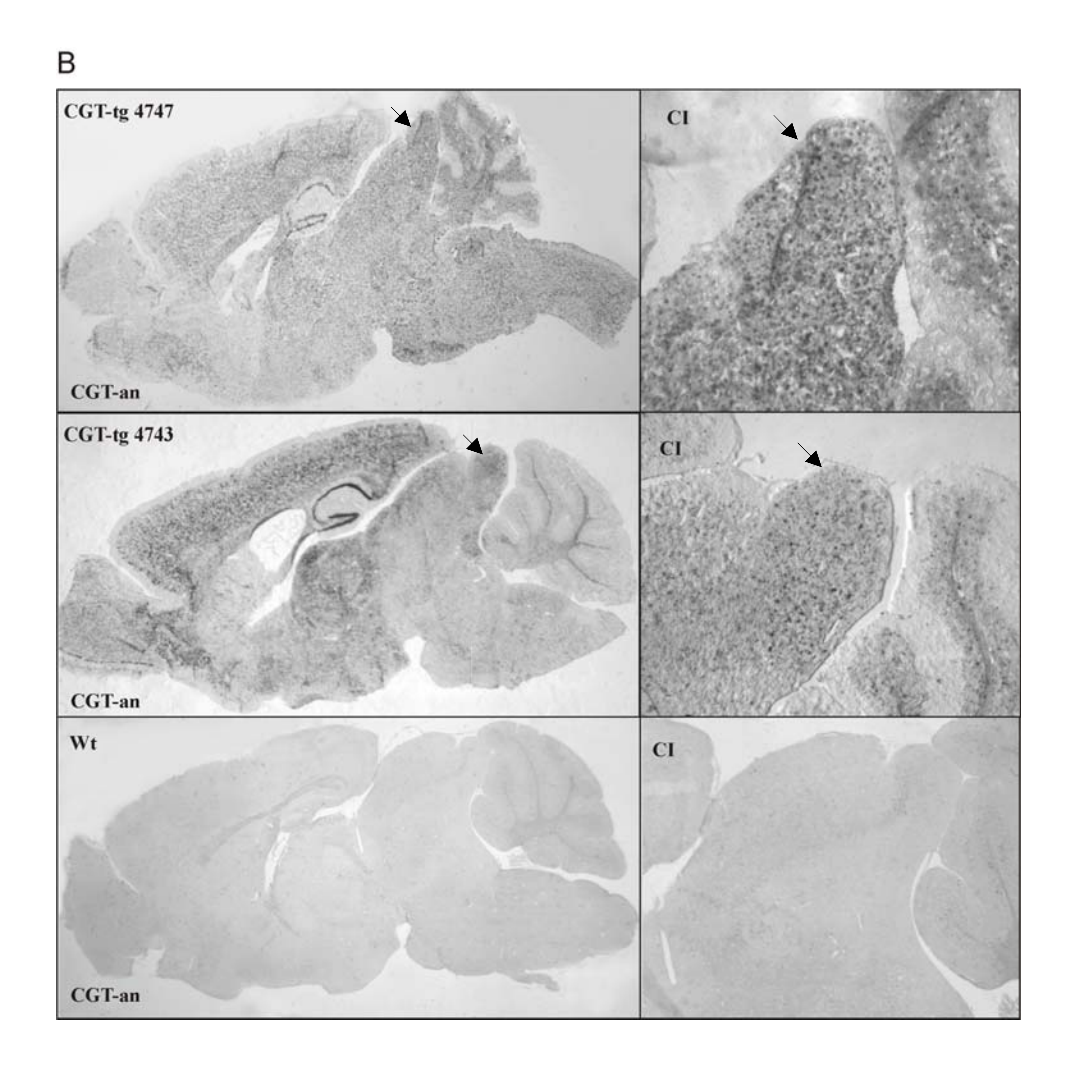


Abb. 3.18: *In situ*-Hybridisierung von Thy-1-CGT-Mäusen. In A ist die Struktur des CGT-Transgen-Konstrukt dargestellt, das zur Generierung der transgenen CGT-Mäuse genutzt worden ist (Eckhardt et al., 2007). In B sind die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung der Gehirne von 120 Tagen alten Thy-1-CGT-Mäusen von der Linie 4747 und 4743 sowie von Wildtyp-Tieren (wt) mit der CGT-RNA-Sonde beispielhaft dargestellt. Neben dem jeweiligen sagitalen Kryogehirnschnitt ist eine Großaufnahme des Colliculus inferior (CI) zu sehen. Die Pfeile markieren den Colliculus inferior. CGTan = CGT RNA antisense-Sonde.

3.2.2 Analyse der Überlebensdauer und der audiogenen Anfälle der Thy-1-CGT-Mäuse

Bei den transgenen Mäusen war unabhängig vom genetischen Hintergrund eine verkürzte Lebensspanne zu beobachten. Des Weiteren wurden Anfälle festgestellt, die sich in unkontrolliertem Springen und Laufen sowie in Muskelkrämpfen äußerten. Ausgelöst wurden diese Anfälle durch audiogene Reize. Um eine quantitative Aussage zu den audiogenen Anfällen machen zu können, wurden die Tiere einer milden akustischen Stimulation ausgesetzt, genauer gesagt einem Schlüsselklirren, wie bei Kawai et al., 2001 beschrieben. Diese Beobachtungen sind in der Abbildung 3.19 statistisch ausgewertet. Für die Erstellung der Überlebenskurve wurden alle Tiere aus Würfen der beiden Linien verwendet, die nicht für andere Zwecke gebraucht worden sind. Die Überlebenskurve wurde nach dem Kaplan-Meier-Verfahren erstellt. Das Kaplan-Meier-Verfahren dient der Schätzung der Überlebens-Wahrscheinlichkeit in einem bestimmten Zeitintervall. Um eine quantitative Aussage über die Reaktion auf eine akustische Stimulation machen zu können, wurden die Tiere dem akustischen Stimulus Schlüsselklirren (ca. 90-100 dB) für 5-10 Sekunden ausgesetzt. Hierfür wurden Tiere von jedem Genotyp im Alter von drei, sieben und elf Wochen untersucht. Der Prozentsatz der Tiere, die auf den Stimulus mit unkontrolliertem wilden Hin- und Herlaufen (weiße Balken) reagierten, bzw. nach einem tonisch-klonischen Krampfanfall (schwarze Balken) verstarben, ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

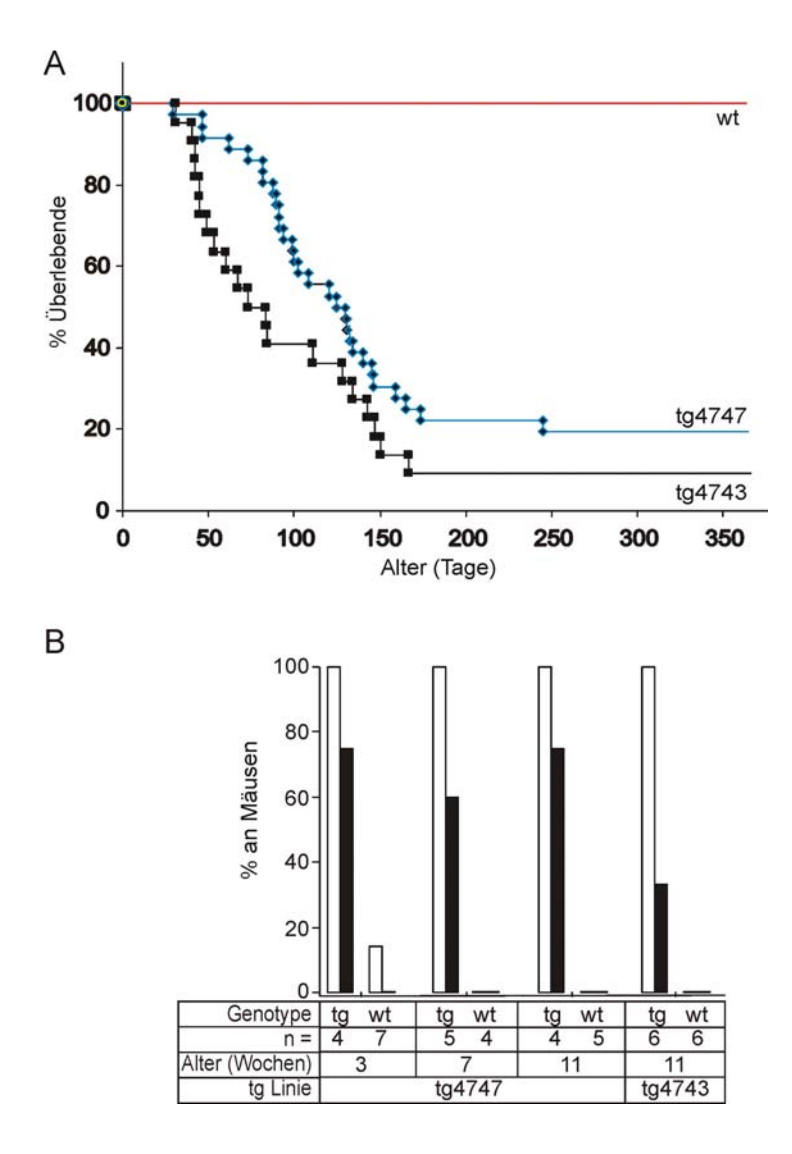


Abb. 3.19: Überlebenskurve und letale audiogene Anfälle von transgenen Thy-1-CGT-Mäusen. In A ist die Kaplan-Meier-Überlebenskurve der beiden transgenen Linien tg 4747 und tg 4743 sowie der Wildtyp-Tiere dargestellt. Es wurden beide Geschlechter in die Berechnung mit einbezogen und bei den Wildtypen beide Linien zusammengefasst. In B ist in Prozent die Reaktion auf die akustische Stimulation (Schlüsselklirren; 90-100 dB), das wildes Hin- und Herlaufen (weiße Balken) und der sofort nach dem Anfall auftretende Tod (schwarze Balken) gezeigt. Die Auswertung wurde freundlicherweise von Dr. M. Eckhardt durchgeführt.

Aus der Überlebenskurve ist ersichtlich, dass die transgenen Mäuse beider Linien eine signifikant reduzierte Lebensspanne aufwiesen (Abb. 3.19 A). Innerhalb der ersten Lebenswochen (11-18) starben 50 % der Tiere, wobei die Tiere der Linie 4743 verstärkte Symptome zeigten und schon nach 11 Wochen und die Tiere der Linie 4747 nach 18 Wochen eine 50 %ige Sterberate erreichten.

Die gesteigerte Anfälligkeit für akustische Reize scheint der Grund für die hohe Sterberate zu sein. Dieser akustische Reiz von 90-100 dB, bei einer Frequenz zwischen 3500-20500 Hz löste unkontrolliertes wildes Hin- und Herlaufen aus, auf das oft ein klonisch-tonischer Anfall folgte (Abb. 3.19 B). Bei beiden Linien wurde dieses Verhalten beobachtet. Zusätzlich

starben zwischen 35 % (tg 4743) und 75 % (tg 4747) der transgenen Mäuse innerhalb von 20 Sekunden an Atemstillstand (Abb. 3.17 B). Bei den Wildtyp-Mäusen waren mit einer Ausnahme keine audiogenen Anfälle zu beobachten.

Beobachtungen dieser Mäuse zeigten außerdem ein hyperaktives Verhalten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Um diese erhöhte Aktivität zu analysieren, wurde mit den transgenen Mäusen ein sogenannter „Open-field“-Test durchgeführt. Mit diesem Test werden verschiedene Aktivitätsparameter analysiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die generelle motorische Aktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren gesteigert ist. Zur Analyse wurden Tiere beider Linien, 4747 und 4743, im Alter von sechs und 17 Wochen getestet. Für den „Open-field“-Test wurden Wildtyp- (n=40) und tg 4747- und tg 4743-Tiere (n= 25) herangezogen (Abb. 3.20). Die Ergebnisse des „Open-field“-Testes zeigten einige Gemeinsamkeiten, aber auch einige Unterschiede im Verhalten von Kontroll- und transgenen Tieren auf: So ist die zurückgelegte Strecke und die Durchschnittsgeschwindigkeit für die Gruppen etwa gleich. Werden jedoch die Parameter betrachtet, die mit der lokomotorischen Aktivität zu tun haben, so sind Veränderungen bei den transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zu beobachten: So waren die Anzahl der Sprünge deutlich erhöht. Bei den älteren Tieren zeigte sich, dass beide Geschlechter sich wesentlich weniger im Zentrum der Box aufhielten, d.h. dass sie weniger in der Mitte saßen bzw. die Mitte der Box durchquert haben. Dies könnte darauf hindeuten, dass die älteren transgenen Mäuse mit der Zeit ein vermindertes Gehör besitzen und somit ihre Umgebung schlechter wahrnehmen können. Dies korreliert auch mit den beobachteten Anfällen. Je älter die Mäuse wurden, traten die Anfälle nicht mehr so häufig auf wie in den ersten Lebenswochen.

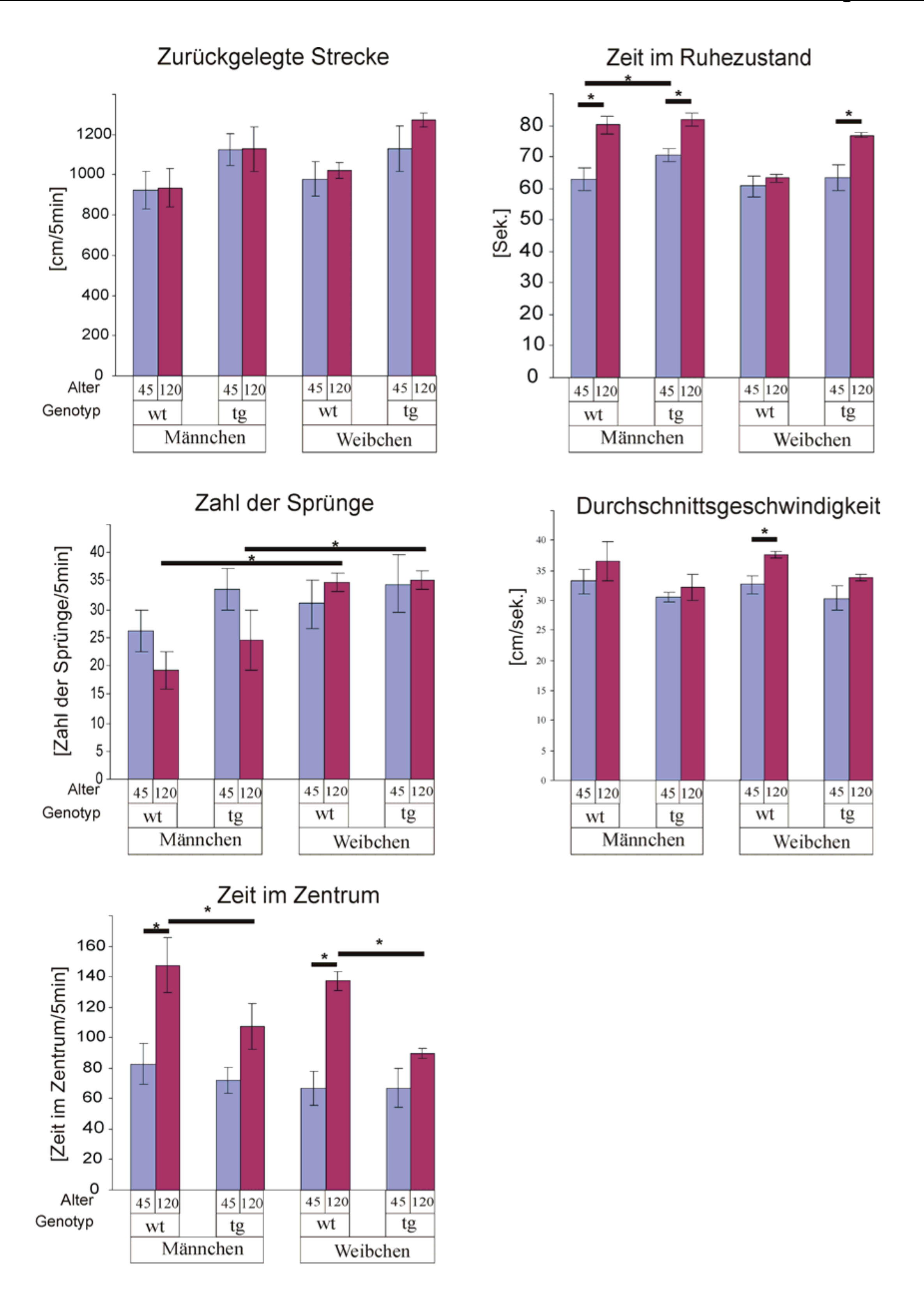


Abb. 3.20: Ergebnisse des „Open-field"-Verhaltenstests mit sechs bzw. 17 Monate alten Thy-1 CGT Mäusen. Darstellung von Teilergebnissen der Wildtyp- (wt) und der transgenen Tieren (tg), die für fünf Minuten in der „Open field"-Box beobachtet wurden. Tiere im Alter von 45 Tagen (sechs Wochen; blaue Balken) und 120 Tagen (17 Wochen; rote Balken) wurden analysiert. Es sind jeweils die Mittelwerte mit ANOVA mit anschließendem Fischer LSD-Test ausgewertet worden. Die Fehlerbalken stellen die errechneten Standardfehler (x +/- SEM; n=25-40) dar. Ein Stern signalisiert einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test, *= p < 0.05).

3.2.3 Induktion und Bestimmung der c-Fos-Expression im Colliculus inferior bei Thy-1-CGT-Mäusen

Ein spezieller Bereich im Gehirn ist für die Verarbeitung und Weiterleitung von akustischen Signalen verantwortlich. Dieser Bereich wird Colliculus inferior genannt und befindet sich zwischen Kleinhirn und Cortex. Im Colliculus inferior werden erregende und hemmende Signale von den Neuronen der Hörbahn und der Hörrinde verarbeitet. Der zentrale Bereich hat eine tonotope Organisation, wobei die Frequenzachse von dorsal nach ventral verläuft, also von tiefen zu hohen Frequenzen. Faingold zeigte, dass der Colliculus inferior eine zentrale Rolle bei der Induktion von audiogenen Anfällen spielt (Faingold, 2002). Wie schon in der *in situ*-Hybridisierung zu sehen war, wird das CGT-Transgen stark im Bereich des Colliculus inferior exprimiert (Abb. 3.21 A). Um die durch Anfälle induzierte Hyperaktivität der Neuronen im Colliculus inferior sichtbar zu machen, wurde die Expression des c-fos-Genes in den transgenen Mäusen analysiert. c-Fos ist ein Proto-Onkogen, das zur Familie der „immediate early genes“-Transkriptionsfaktoren gehört. Die Transkription von c-fos ist bei neuronaler Aktivität stark hochreguliert und wird daher als Marker für neuronale Aktivität eingesetzt (Bullit, 1990; Klein et al., 2004). Für diese Analyse wurden die Mäuse gewählt, die nach dem akustischen Reiz das unkontrollierte Hin- und Herlaufen zeigten, aber nicht starben, sowie Mäuse, die keinem Reiz ausgesetzt waren. Eine Stunde nach dem Anfall wurden die Tiere perfundiert und Kryoschnitte von 12-14 µm Dicke angefertigt. Über c-Fos-Immunhistochemie wurde die Anzahl der c-Fos-positiven Zellen bestimmt. Die transgenen Mäuse, die nicht dem akustischen Reiz ausgesetzt waren, zeigten bereits eine signifikant verdoppelte Anzahl der c-Fos-exprimierenden Neuronen im Colliculus inferior im Vergleich zum Wildtyp-Tieren. Eine Stunde nach dem Schlüsselklirren war die Anzahl bei den transgenen Mäusen der c-Fos-positiven Zellen sogar um das sechsfache erhöht (Abb. 3.21 B).

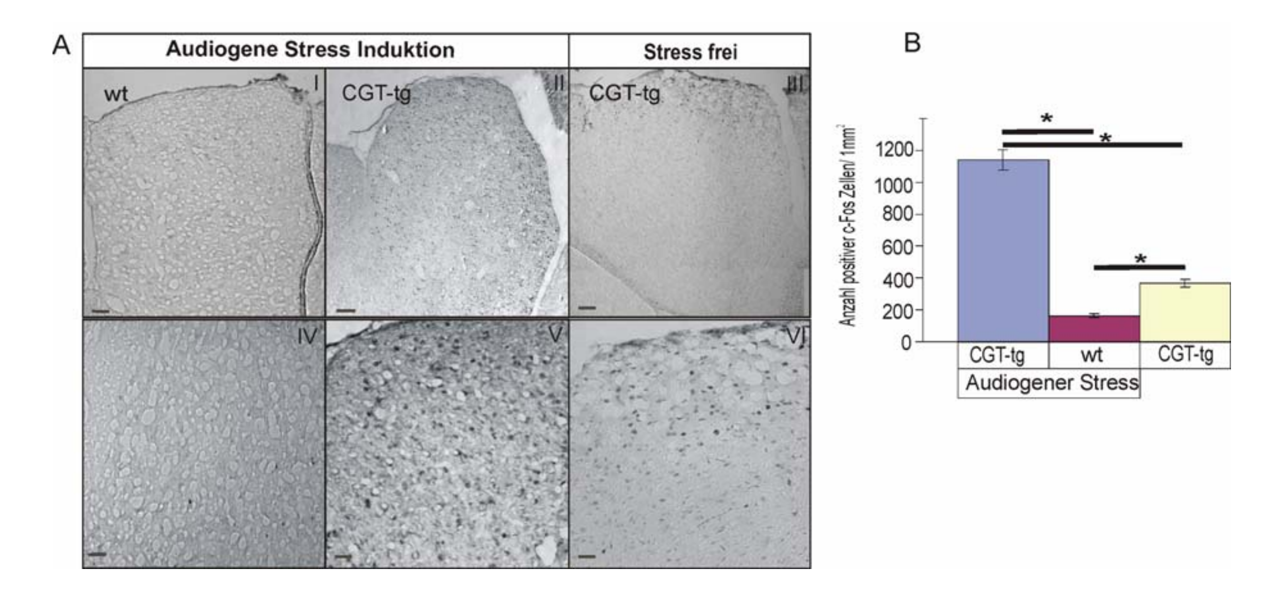


Abb. 3.21: c-Fos-Immunhistochemie des Colliculus inferior. In A ist die c-Fos Expression (schwarze Punkte) in den transgenen Mäusen (CGT-tg) nach einem akustischen Reiz zu sehen. Nach einer Stunde des Reizes wurden die Tiere, die mit Anfällen reagiert haben, mittels c-Fos Immunhistochemie (1:3000) analysiert. Zusätzlich wurden auch Tiere untersucht, die dem akustischen Reiz nicht ausgesetzt waren. In B ist die Quantifizierung von c-Fos-positiven Zellen/mm^2 dargestellt. Audiogener Stress n=6; ohne audiogenen Stress n=3. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm (I-III), 50 µm (IV-VI).

Da sowohl das Transgen CGT als auch c-Fos im Colliculus inferior bei den transgenen Tieren hochreguliert ist, wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit der CGT-RNA-Sonde und eine anschließende c-Fos-Immunhistochemie durchgeführt. So konnte festgestellt werden, ob die transgenen CGT-exprimierenden Zellen gleichzeitig c-Fos-positiv sind. Für diese Untersuchung wurden ebenso wie bei der Analyse der c-Fos-Expression 120 Tage alte Mäuse genommen, die einem akustischen Reiz unterzogen worden waren. In der Abbildung 3.22 A ist zu sehen, dass bei den transgenen Tieren die CGT-exprimierenden Zellen nahezu alle c-Fos positiv sind. Zwei Drittel der c-Fos-markierten Zellen exprimiert das Transgen CGT. Dies lässt vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von CGT und dem hoch regulierten c-Fos besteht.

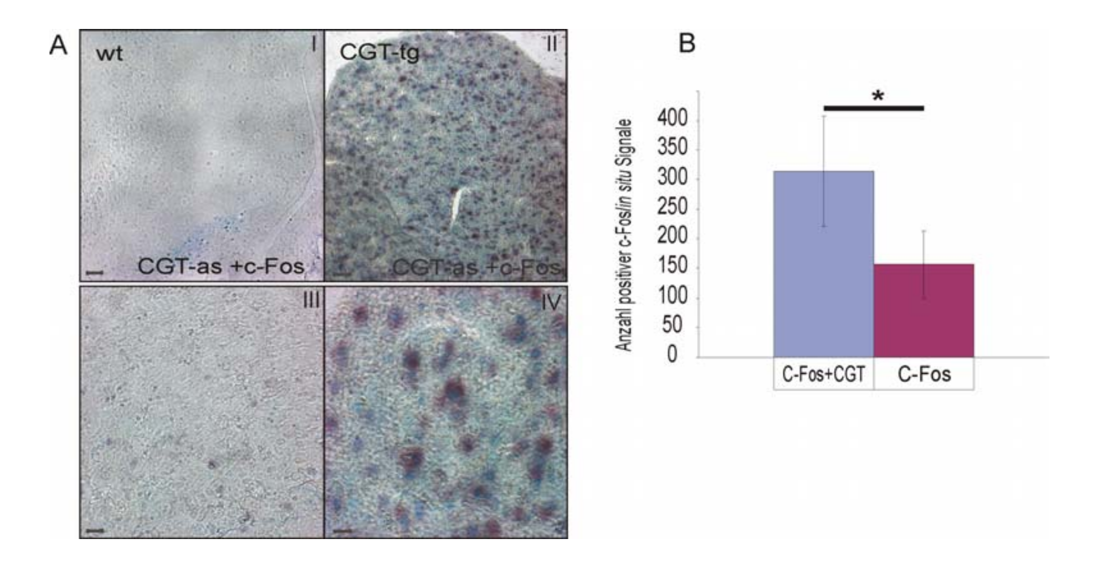


Abb. 3.22: *In situ*-Hybridisierung mit c-Fos-Immunhistochemie im Colliculus inferior. In A sind die Färbungen mit der CGT-RNA-Sonde und dem c-Fos-Antikörper (1:3000) zu sehen, jeweils von Thy-1-CGT- und Wildtyp-Mäusen. Der Maßstabbalken entspricht 50 µm (I-II), 20 µm (III-IV). In B ist die Auszählung (n=6) der CGT- und c-Fos-positiven Zellen im Bereich des Colliculus inferior abgebildet.

3.2.4 Isolierung von Lipiden aus Thy-1–CGT-Mäusen und Analyse des Sulfatid-Gehalts in der neuronalen Plasmamembran

Die bereits festgestellte gesteigerte Expression von CGT könnte unter anderem der Grund für das veränderte Verhalten der Thy-1-CGT-Mäuse sein. Die gesteigerte Expression an CGT führt eventuell zu einem erhöhten Gehalt an GalCer und/oder Sulfatid und hat somit einen Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Neuronen der transgenen Mäuse.
Daher wurde eine Lipid-Analyse der neuronalen Plasmamembranen durchgeführt. Da jedoch ein großer Anteil von GalCer und Sulfatid im Gehirn aus dem Myelin stammt, wurde zunächst die neuronale Plasmamembran durch ein modifiziertes zwei-Stufen-Zentrifugations-Protokoll isoliert. Dabei wurde im ersten Gradienten das Myelin entfernt und im zweiten Gradienten die Plasmamembran gewonnen. Mittels Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass das Myelin entfernt worden ist. Hierzu wurde der MBP-(Myelin basisches Protein) Antikörper verwendet. Die Anreicherung der Plasmamembran (PM) wurde mit dem Na^+/K^+-ATPase-Antikörper kontrolliert (Abb. 3.23 A). Die extrahierten Lipide der Plasmamembran wurden mittels TLC (Abb. 3.23 B) und ESI-MS (Abb. 3.24 A-B) untersucht. Für diese Analyse wurden Gehirne von 120 Tage und 18 Monate alten Thy-1 CGT Mäusen verwendet.

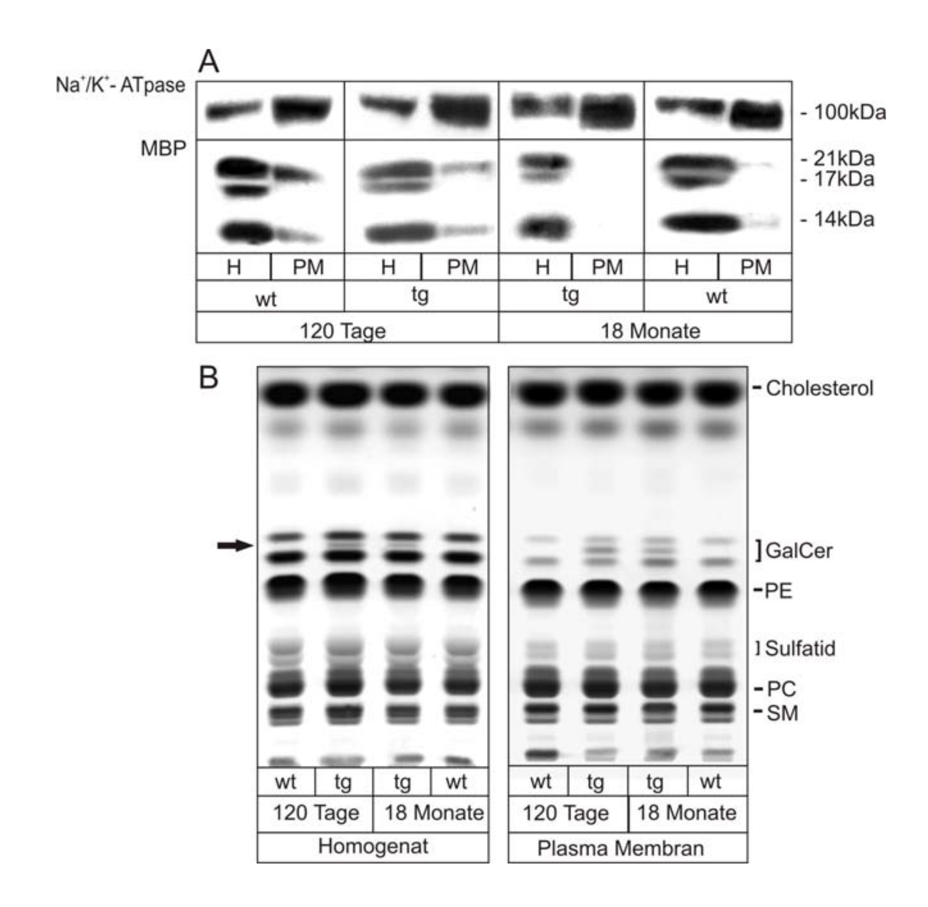


Abb. 3.23: Western-Blot und Lipid-Analyse des Gehirns von Thy-1-CGT-transgenen Mäusen. A: 50 µg Protein aus dem Homogenat (H) und der Plasmamembran (PM) Isolierung wurden aufgetragen und die Anreicherung der PM mit Na^+/K^+-ATPase-Antikörper (1:1000) und die Entfernung von Myelin mit MBP-Antikörper (1:5000) nachgewiesen. B: Gesamtlipide (normiert auf Cholesterol) aus der PM und dem Homogenat wurden isoliert und mittels HPTLC-Platten im Laufmittel Chloroform/Methanol/dH_2O im Verhältnis 65:25:4 analysiert. Die entsprechenden Standards wurden auf der gleichen Dünnschicht-Platte aufgetragen. Insgesamt wurden je Genotyp n = 3 Tiere analysiert. GalCer = Galaktosylceramid, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin; der Pfeil zeigt C18:0 GalCer an.

Wie in der TLC zu sehen, ist C18:0-GalCer in der Plasmamembran-Fraktion angereichert (Abb. 3.23 B, Pfeil). Weiterhin ist vor allem die untere Sulfatid-Bande, die C18:0 Sulfatid beinhaltet, gesteigert. Eine genaue Bestimmung der Sulfatid-Spezies wurde mit Hilfe der ESI-MS durchgeführt (Abb. 3.24). Die Zugabe des internen C12:0-Sulfatid-Standard (1111 pmol/~200mg Feuchtgewicht) erlaubte eine Quantifizierung. Die Massen-Spektren zeigen bei den transgenen Mäusen einen deutlichen Anstieg an C18:0 Sulfatid (Massen-Peak bei 806.7 m/z). Die Quantifizierung zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den transgenen und den Wildtyp-Tieren. In der Abbildung 3.24 B ist die Quantifizierung über den internen Standard dargestellt. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen den jungen und den alten transgenen Tieren festgestellt werden.

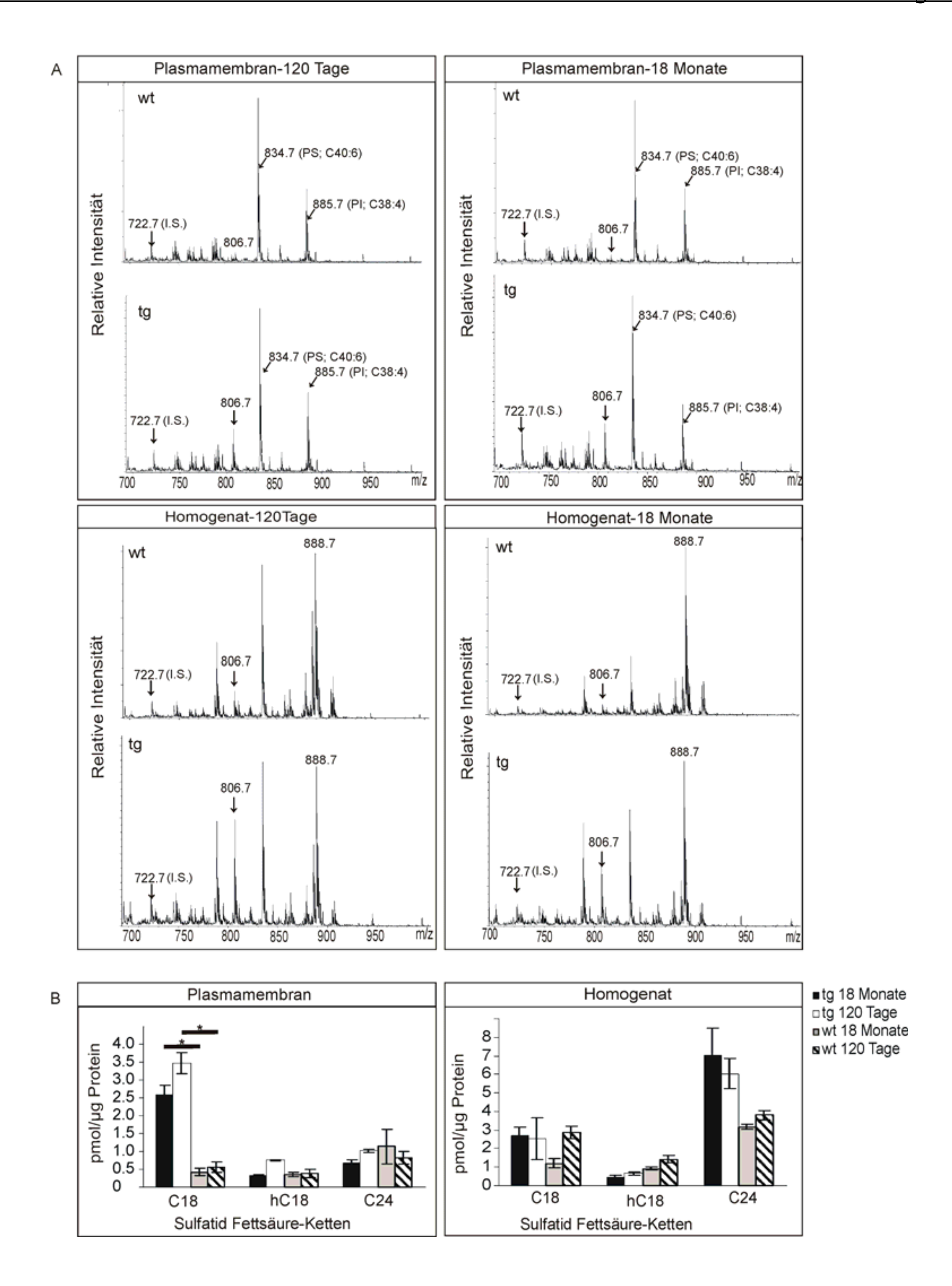


Abb. 3.24: Quantitative Bestimmung der Sulfatid-Spezies in der Plasmamembran von Thy-1-CGT-Mäusen. A: Repräsentative ESI-Spektren der Plasmamembran- und Homogenat-Gesamtlipide. Die Lipide wurden in Gegenwart von C12:0 Sulfatid-Standard (interner Standard, IS, 722.7 m/z) extrahiert und im negativen Modus gemessen. Der Peak von 806.7 m/z entspricht einem Sulfatid mit einem C18:0-Fettsäurerest, 888.7 m/z entspricht einem Sulfatid mit einem C24:1-Fettsäurerest. B: Quantifizierung von Sulfatid mit einem C18:0-, hydroxyliertem C18:0- und C24:1-Fettsäurerest in der Plasmamembran und im Homogenat von 120 Tage und 18 Monate alten transgenen Thy-1-CGT- und Wildtyp-Mäusen. Die Massen-Peaks bei 834.7 m/z und 885.7 m/z wurden über MS/MS Fragmentierung als C40:6 Phosphatidylserin (PS) und C38:4 Phosphatidylinositol (PI) identifiziert.

3.2.5 Analyse der Ganglioside von transgenen Thy-1-CGT-Mäusen

In der Literatur wird beschrieben, dass letale audiogene Anfälle mit einer Veränderung des Sphingolipid-Metabolismus einhergehen. Mäuse, die ausschließlich das Gangliosid GM3 synthetisieren, zeigten eine ähnliche Sensitivität gegenüber akustischer Stimulation wie die transgenen Thy-1-CGT-Mäuse (Kawai et al., 2001). Daher wurde der Gangliosid-Gehalt der Gehirn-Bereiche Colliculus inferior, Cortex, Kleinhirn und Stammhirn der transgenen Mäuse untersucht. Hierzu wurden jeweils 120 Tage alte transgene und Wildtyp-Tiere verwendet. Die Ganglioside wurden nach der Methode von Folch et al. (1957) mit anschließender Aufreinigung der Ganglioside über eine C18-reversed-Phase-Kartusche (SEP-PAK_{18}, Millipore) extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden kommerziell erhältliche Ganglioside verwendet. Abbildung 3.25 A zeigt repräsentative Dünnschichtchromatographien der aufgereinigten Ganglioside. Eine Erhöhung an GM3 oder andere Gangliosiden konnte bei transgenen CGT-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht festgestellt werden, weder im Colliculus inferior noch in den anderen untersuchten Gehirnregionen.

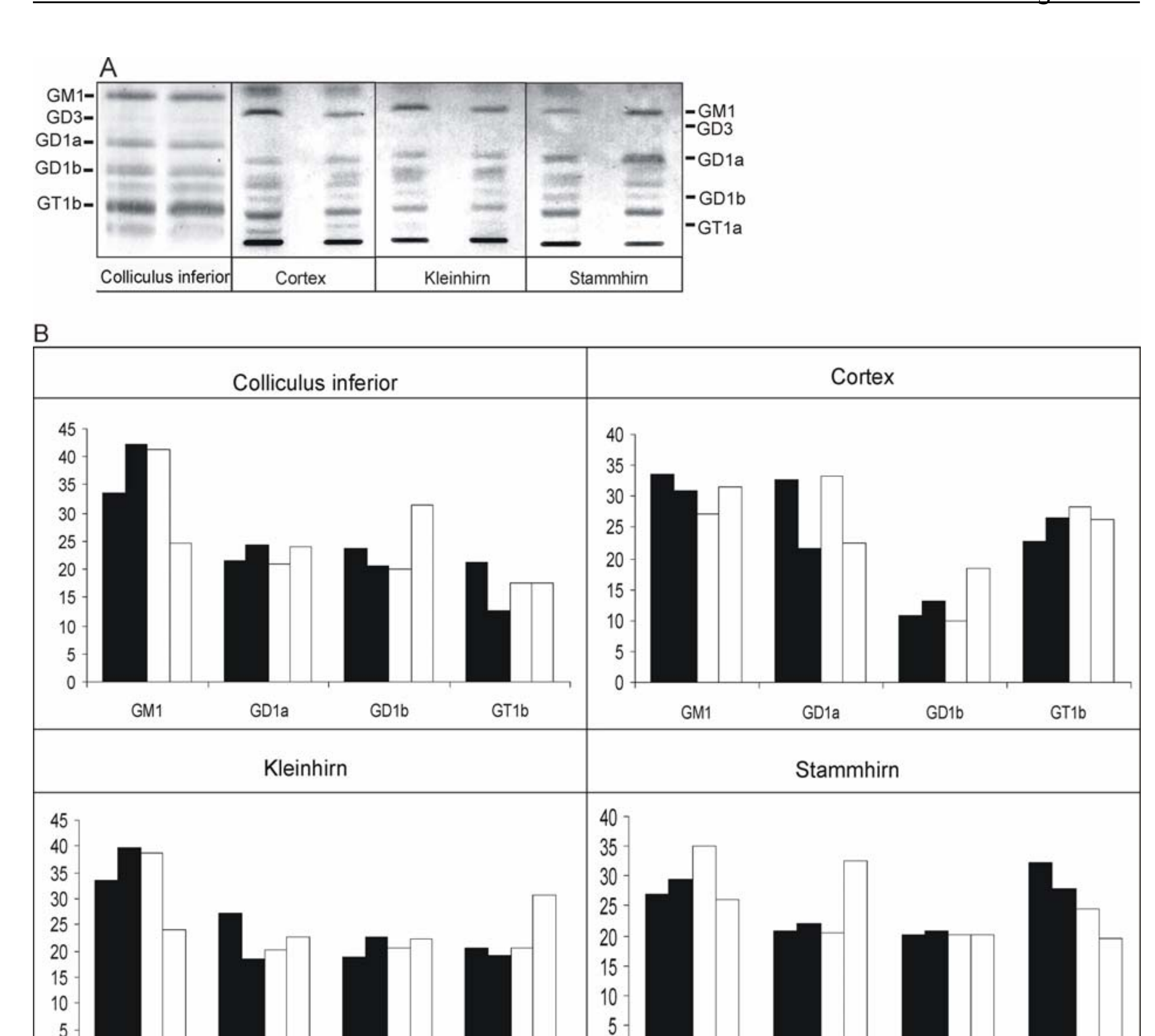


Abb. 3.25: Analyse der Ganglioside von transgenen Thy-1-CGT-Mäusen. Ganglioside aus den Gehirn-Bereichen des Colliculus inferior, Kleinhirn, Stammhirn und Cortex von 120 Tage alten Mäusen wurden isoliert und mittels HPTLC-Platten aufgetrennt. A stellt eine Dünnschichtchromatographie (Laufmittel Chloroform/Methanol/0,22% $CaCl_2$ 60:35:8) von zwei untersuchten Tieren pro Genotyp (n=2) dar, während die quantitative Auswertung in B zu sehen ist. Die hier quantifizierten Ganglioside (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) ergeben zusammen 100 %.

Des Weiteren wurde eine Lipid-Analyse der Sphingolipide des Cortex und des Colliculus inferior von 120 Tage alten transgenen Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Wie in der TLC zu erkennen ist (Abb. 3.26 A), führt die transgene Expression der CGT zu einer weiteren GalCer-Bande, die sich zwischen der nicht hydroxylierten (non-fatty acid, NFA) und der hydroxylierten (high fatty acid, HFA) GalCer-Bande befindet (Abb. 3.26 A). Diese Bande wurde mit Hilfe von Massen-Spektrometrie identifiziert als C18:0-

GalCer (Eckhardt et al., 2007). Die ESI-MS Untersuchung der kortikalen Lipide zeigte einen erhöhten C18:0-Sulfatid-Peak (Massen-Peak 806.7 m/z). Da Neuronen kein hydroxyliertes C18:0-Sulfatid besitzen, spricht das Verhältnis von nicht-hydroxyliertem zu hydroxyliertem C18:0 dafür, dass ein Anstieg an C18:0-Sulfatid vorhanden war (Abb. 3.26 B-C).

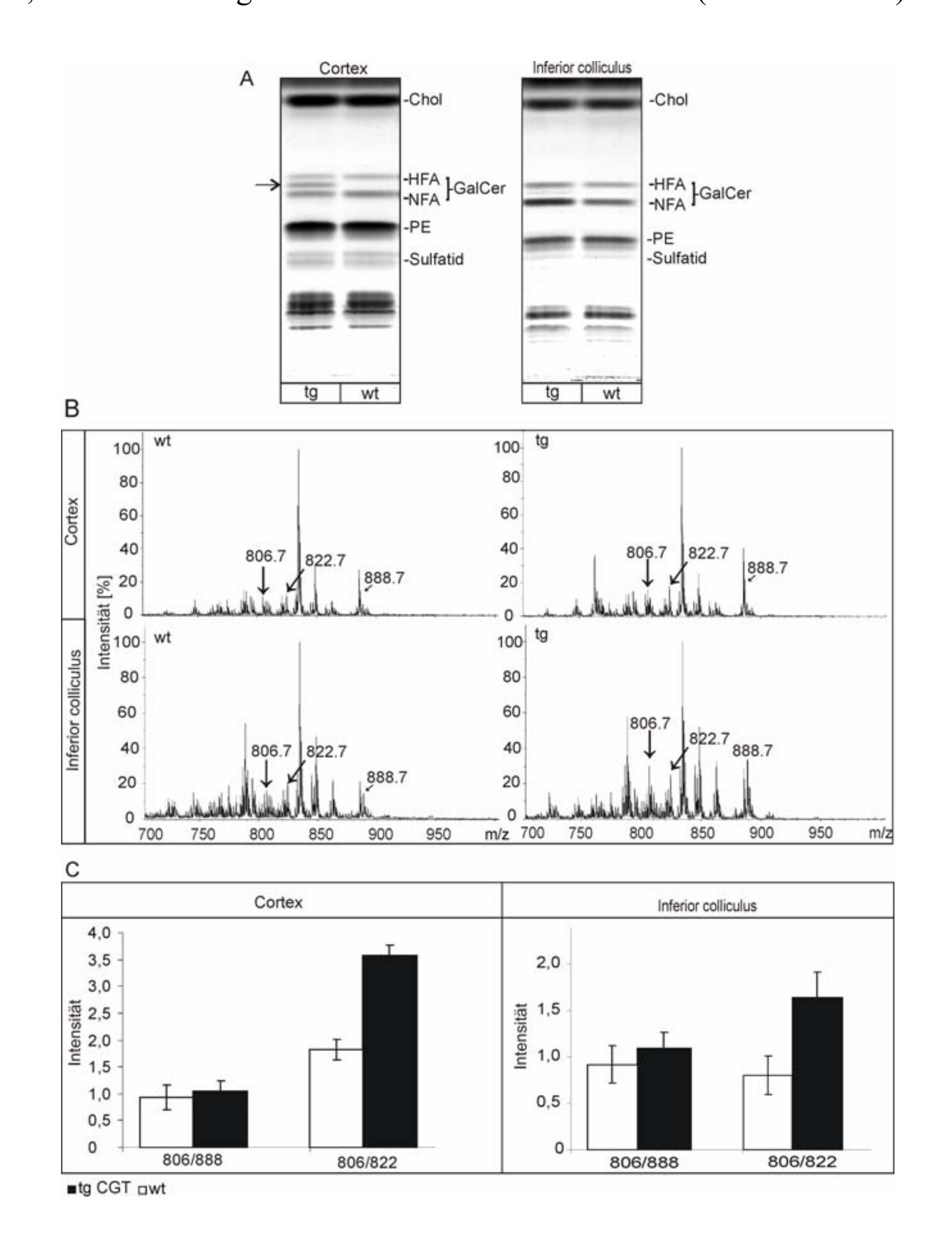


Abb. 3.26: Lipid-Analyse des Cortex und des Colliculus inferior von 120 Tage alten Thy-1-CGT-Mäusen. A: Dünnschichtchromatographie der Gesamtlipide des Cortex und des Colliculus inferior von 120 Tage alten transgenen und Wildtyp-Tieren als Kontrolle. Der Pfeil markiert C18:0-GalCer. Standards sind auf der rechten Seite angezeigt: Chol=Cholesterol, GalCer=Galaktosylceramid, PE=Phosphotidylethanolamin, PC= Phosphotidylcholin, SM= Sphingomyelin. B: ESI-MS Analyse der cortikalen Lipide. Gemessen im negativ Modus. Der Peak von 806.7 m/z entspricht einem Sulfatid mit einem C18:0-Fettsäurerest, 888.7 m/z entspricht einem Sulfatid mit einem C24:1-Fettsäurerest und 822.7 m/z entspricht hydroxylierten-C18:0-Sufatid (hC18:0-Sulfatid). C: Quantifizierung von C18:0-, hC18:0- und C24:1 Sulfatid im Cortex und im Colliculus inferior von 120 Tage und 18 Monate alten transgenen Thy-1-CGT- und Wildtyp-Mäusen. Die Massen-Peaks wurden im Verhältnis zueinander gesetzt, da kein interner Standard zugesetzt worden ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Anstieg an C18:0-GalCer und C18:0-Sulfatid der einzige signifikante Unterschied in der Lipidzusammensetzung in transgenen Neuronen ist. Das weist darauf hin, dass der erhöhte GalCer- und/oder Sulfatid-Gehalt in der neuronalen Plasmamembran der Grund für die Anfälligkeit gegenüber akustischen Reizen ist, die audiogene Anfälle bei den transgenen Tieren auslösen.

3.2.6 Lipid-Analyse der Plasmamembran von transgenen CGT-, CST- und CGT/CST-Mäusen

Um die Hypothese zu bestätigen, dass die transgenen CGT-Mäuse aufgrund des erhöhten Sulfatid-Gehalts empfindlich auf einen akustischen Reiz mit einem Anfall reagieren, wurde versucht, in den Neuronen den Sulfatid-Gehalt zu steigern. Dies wurde erreicht durch zusätzliches Einbringen eines weiteren Transgens, der Cerebrosid-Sulfotransferase (CST). Die folgenden Experimente wurden mit transgenen Tieren durchgeführt, die einen gemischten Hintergrund (C57BL/6 / 129 Ola) besitzen, da es nicht möglich war, reine transgene CST-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund zu erhalten. Des Weiteren waren alle transgene CST-Mäuse ASA-defizient. Diese Tiere wurden mit den transgenen CGT-Tieren verpaart und so CST-, CGT und CGT/CST-doppelt-transgene Tiere generiert. Die so erhaltenen Mäuse waren in Bezug auf das ASA-Gen heterozygot und hatten einen gemischten Hintergrund von 75 % C57BL/6 und 25 % 129/Ola. Die Heterozygotie des ASA-Gens hat keinen Effekt auf den Sphingolipid -Gehalt. Es wurde keine Akkumulation von Sulfatid in heterozygoten ASA-Tieren festgestellt (Stroobants et al., 2008).
Die Analyse der Lebenserwartungen bei den transgenen Mäusen, freundlicherweise durchgeführt von Dr. M. Eckhardt, zeigte, dass die transgenen CST-Tiere eine normale Lebensdauer hatten. Jedoch wiesen 10 % der transgenen CGT-Mäuse mit dem genetisch gemischten Hintergrund eine verkürzte Lebensdauer auf (starben innerhalb der ersten zwölf Monate). Allerdings zeigten die doppelt-transgenen CST/CGT-Mäuse innerhalb der ersten elf Lebenswochen eine 50 %ige-Sterberate. Es wurde mit diesen transgenen CGT- und CST/CGT-Tieren auf gemischtem Hintergrund ebenfalls eine akustische Stimulation durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass diese transgenen-CGT Mäuse mit dem genetisch gemischten Hintergrund ebenso wie die mit C57BL/6-Hintergrund audiogene Anfälle bekommen. Allerdings starben keine transgenen CGT-Tiere auf gemischtem genetischen Hintergrund als Antwort auf den akustischen Reiz. Im Gegensatz dazu starben fast 70 % der transgenen doppel-CGT/CST-Mäuse an auf die Anfälle folgendem Atemstillstand.

Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde eine Analyse der Plasmamembran von diesen transgenen Mäusen durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Überprüfung der Aufreinigung der Plasmamembran anhand einer Western-Blot-Analyse (Abb. 3.27 A). In der Abbildung des Western-Blots ist eine erfolgreiche Anreicherung der Plasmamembran zu erkennen. Dies zeigt sich zum einen durch ein verstärktes Western-Blot-Signal des Na^+/K^+-Kanal-Antikörper (spezifischer Membran-Marker) bei den Plasmamembran-Proben und zum anderen weisen diese Proben ein schwaches bis kein Signal des MBP-Antikörpers (spezifischer Myelin-Marker) im Vergleich zu den Homogenat-Proben auf. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Plasmamembran-Proben durch Myelin kontaminiert sind.
Nach der Lipidextraktion wurden die Fraktionen der Plasmamembran und des Homogenates über die TLC sowie mittels der ESI-MS analysiert.
Die Lipid-Analyse der isolierten Plasmamembran von den vier untersuchten Genotypen (transgen-CST, transgen-CGT, transgen-CGT/CST und Wildtyp) zeigte eine vergleichbar starke C18:0-–GalCer-Bande bei den transgenen CGT- und den transgenen CGT/CST-Mäusen (Abb. 3.27 B). Die ESI-MS-Daten zeigten, dass der C18:0-Sulfatid-Gehalt bei den transgenen CGT-Mäusen mit dem gemischten genetischen Hintergrund signifikant erhöht ist. Jedoch liegt der C18:0-Sulfatid-Gehalt wesentlich höher bei den doppelt transgenen-CGT/CST-Mäusen im Vergleich zu den transgenen CGT-Mäusen (Abb. 3.27 C, E). Bei den transgenen CST-Tieren war keine Veränderung in der Lipidzusammensetzung zu finden.
Diese Daten zeigen eine deutliche Korrelation zwischen Empfindlichkeit gegenüber audiogenen Reizen und dem C18:0-Sulfatid-Gehalt in der Plasmamembran.

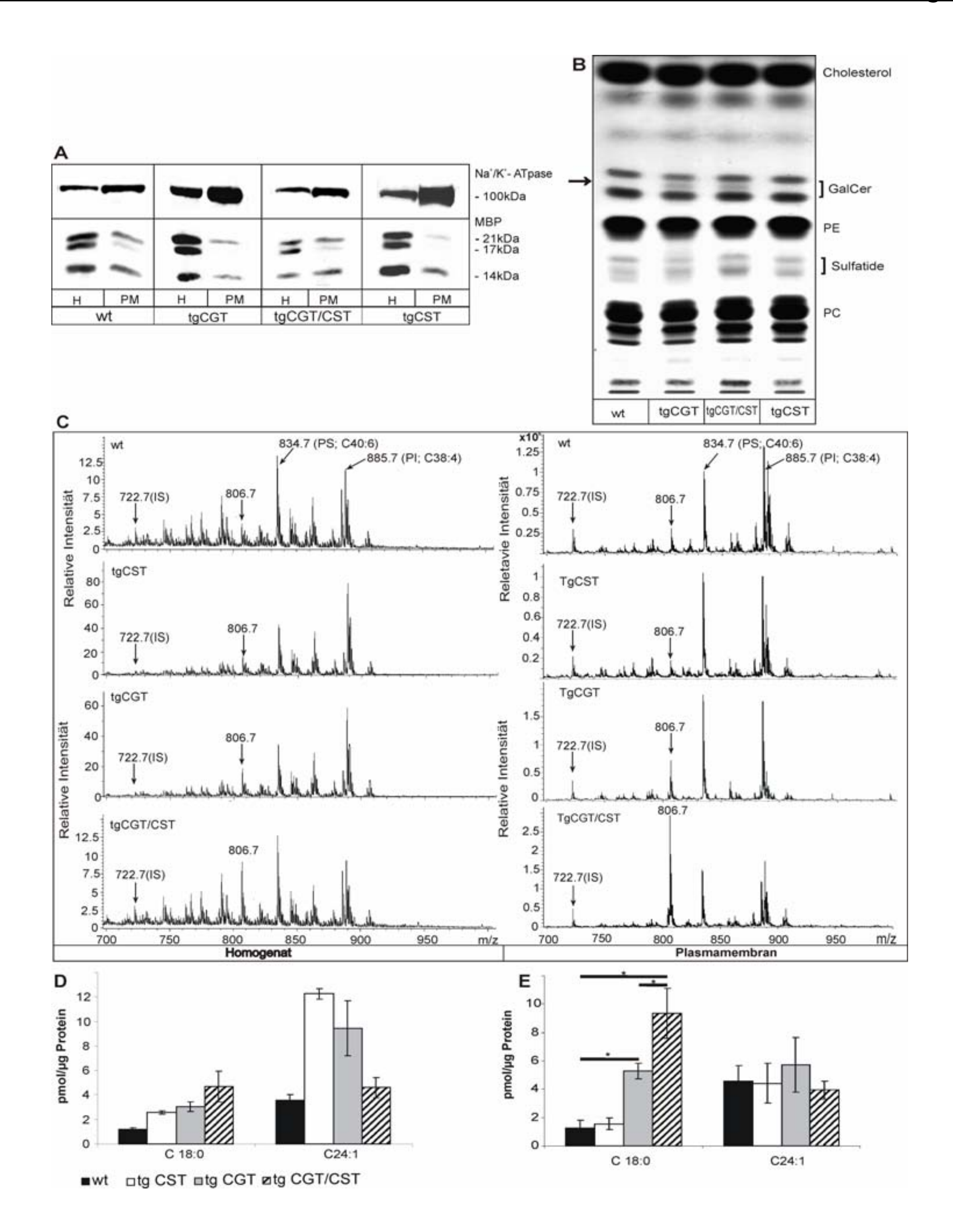


Abb. 3.27: Aufreinigung und Lipid-Analyse der Plasmamembran von transgenen Mäusen mit dem gemischten Hintergrund C57BL/6 x 129 Ola. A: 50 µg Protein aus dem Homogenat (H) und der Plasmamembran (PM)-Isolierung wurden aufgetragen und die Anreicherung der PM mit Na^{+}/K^{+}-ATPase-Antikörper (1:1000) und die Entfernung von Myelin mit MBP-Antikörper (1:5000) nachgewiesen. B: Die Gesamtlipide der PM wurden mit Hilfe von HPTLC aufgetrennt. Der Pfeil zeigt C18:0-GalCer in der angereicherten tg CGT- und tg CGT/CST-PM-Fraktion an. C: Repräsentatives ESI-Chromatogramm vom Homogenat und der PM. Die Lipide wurden in Anwesenheit von einem internen C12:0-Sulfatid-Standard (IS) extrahiert und im negativ Modus gemessen. Der Peak von 806.7 m/z entspricht einem Sulfatid mit einem C18:0-Fettsäurerest, 888.7 m/z entspricht einem Sulfatid mit einem C24:1-Fettsäurerest Die Massen-Peaks bei 834.7 m/z und 885.7 m/z wurden über MS/MS-Fragmentierung als C40:6 Phosphatidylserin (PS) und C38:4 Phosphatidylinositol (PI) identifiziert. D-E: zeigen die Quantifizierung von C18:0- und C24:1 Sulfatid im Homogenat (D) und in der PM (E) von den vier Genotypen Wildtyp (n=3), tg CST (n=3), tg CGT (n=6) und tg CGT/CST (n=6).

3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der biochemischen und ESI-MS Untersuchungen an den transgenen Thy-1-CGT-Mäusen

Die biochemischen Untersuchungen sowie die Analyse der Sulfatid-Spezies mittels ESI-MS zeigten, dass die transgenen Thy-1-CGT-Mäuse GalCer und Sulfatid in Neuronen synthetisierten sowie eine erhöhte Sterblichkeitsrate besitzen.

Beobachtungen zeigten, dass die transgenen CGT-Mäuse sehr empfindlich gegenüber akustischer Stimulation waren, die teilweise zu letalen audiogenen Anfällen führte.

Mittels c-Fos-Immunhistochemie wurde eine erhöhte neuronale Aktivität im Bereich des Colliculus inferior nachgewiesen.

Analysen der neuronalen Plasmamembran von transgenen CGT-Mäusen ließen einen erhöhten GalCer und C18:0-Sulfatid-Gehalt erkennen.

Dieser gesteigerte C18:0-Sulfatid-Gehalt korreliert mit letalen.

3.3 *In vitro* Zellkulturversuche an der Cerebrosid-Sulfotransferase (CST)

Die Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) ist ein Typ II-Transmembran-Protein, das eine Sulfatgruppe auf Galaktose transferiert. Eine Akkumulation von Sulfatid, hervorgerufen durch einen Defekt des Enzyms Arylsulfatase A (ASA), führt zur metachromatischen Leukodystrophie (MLD), einer lysosomalen Speicherkrankheit. Eine wirkungsvolle Therapie ist bis jetzt noch nicht gegeben. Eine mögliche Option, um MLD zu behandeln, ist die Inhibition des Enzyms CST. Daher sollte die Produktion einer großen Menge an CST ermöglichen, eine Struktur-Analyse durchzuführen und nach möglichen Inhibitoren der CST zu suchen.

Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit verschiedene CST-Fusions-Proteine hergestellt, um nicht-membrangebundene CST in eukaryontischen Zelllinien zu exprimieren. Die Enzyme sollten aus dem Kulturüberstand dieser Zelllinien gereinigt und für strukturelle und funktionelle Analysen eingesetzt werden.

Die verschiedenen CST-Konstrukte wurden sowohl biochemisch sowie auf ihre subzelluläre Lokalisation hin untersucht.

3.3.1 Biochemische Analyse von CST-Fusions-Proteinen

Um das Enzym CST aus dem Kulturüberstand isolieren zu können, wurde zunächst die Transmembran-Domäne entfernt. Diese lösliche CST wurde allerdings nicht in den Kulturüberstand sezerniert, sondern verblieb weiterhin in der Zelle. Daraufhin wurden verschiedene CST-Konstrukte erstellt, die jeweils ausgehend vom N-Terminus um weitere neun Basenpaare verkürzt und mit einem IL-2-Signalpeptid versehen waren (siehe Plasmidkarten im Anhang). All diesen Konstrukten fehlt ebenso die Transmembran-Domäne (Abb. 3.28). Die so erhaltenen CST-Konstrukte, genannt pEF-39CST, pEF-42CST, pEF-45CST, pEF-48CST, pEF-51CST wurden biochemisch untersucht (die Zahl gibt jeweils an, an welcher Aminosäure-Position des CST-Wildtyp-Proteins die CST-Mutante anfängt).

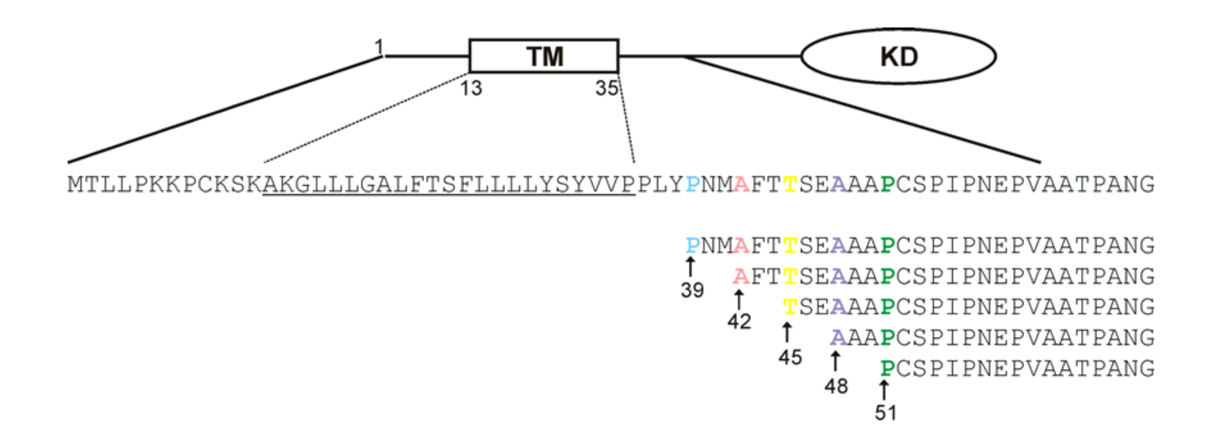
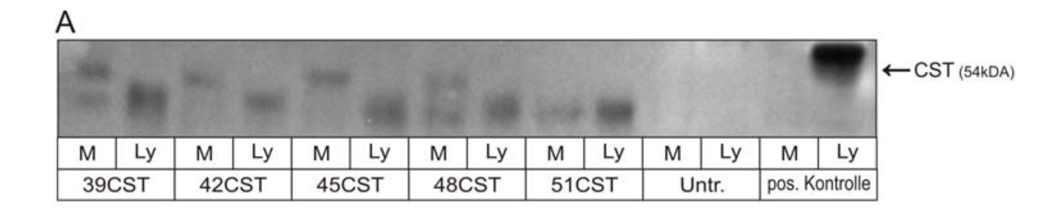


Abb. 3.28: Schematische Darstellung der CST-Konstrukte. Die Aminosäure-Position des jeweiligen Anfangs der CST-Konstrukte nach der Transmembran-Domäne (TM) ist gezeigt. Unterstrichen ist die entfernte Transmembran-Domäne. Die Pfeile und die Zahlen geben jeweils an, an welcher Aminosäure-Position des CST-Proteins der Beginn der Mutanten ist. KD= katalytische Domäne.

Hierfür wurden diese in CHO-KI (Chinese hamster ovary; Wildtyp)-Zellen transfiziert. Nach 72 h wurde der Kulturüberstand entnommen und die Zellen lysiert. Die Proteine des Zelllysats der transfizierten CHO-Zellen sowie der Kulturüberstand wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western-Blot-Verfahren weiterbehandelt. Mit Hilfe des polyklonalen CST-Antiserums ST2 (Yaghootfam et al., 2007) wurde die CST-Expression nachgewiesen. Als positive Kontrolle dienten CHO-Sulf Zellen. Diese Linie exprimiert zusätzlich zur Ceramidgalaktosyltransferase (CGT) stabil die CST (Eckhardt et al., 2002). Im Anschluss daran wurde ein radioaktiver Aktivitäts-Assay mit den CST-Proben durchgeführt, um festzustellen, ob die verkürzten CST-Konstrukte noch Aktivität besitzen. Hierbei wurden die Proben mit [^{35}S]PAPS and Galaktocerebrosid inkubiert. Das Produkt wurde über HPTLC aufgetrennt und mittels Phosphoimager detektiert. Die Western-Blot- Analyse zeigt, dass die verschiedenen CST-Konstrukte exprimiert werden und sowohl im Lysat als auch im Kulturüberstand nachweisbar sind. Allerdings laufen die CST-Banden, die aus dem Kulturüberstand stammen, etwas höher als die in den dazugehörigen Lysaten. Dies ist möglicherweise auf eine Glykosylierung der im Kulturüberstand befindlichen CST-Proteine zurückzuführen. Die Lysat-Banden zeigen ein wesentlich deutlicheres Signal als die CST-Banden aus dem Kulturüberstand. Daher ist davon auszugehen, dass nur ein geringer Teil des CST-Proteins in den Kulturüberstand sezerniert wurde. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die CST-Fusions-Proteine alle noch Aktivität besitzen. Auffällig war jedoch, dass außer der 39CST keine andere CST mehr Aktivität im Kulturüberstand zeigte. Daher wurde nur von der 39CST eine stabile Zelllinie von CHO-K1 Zellen angelegt, die für weitere Untersuchungen wie subzelluläre Lokalisation (Abs. 3.3.2-4) verwendet worden ist.



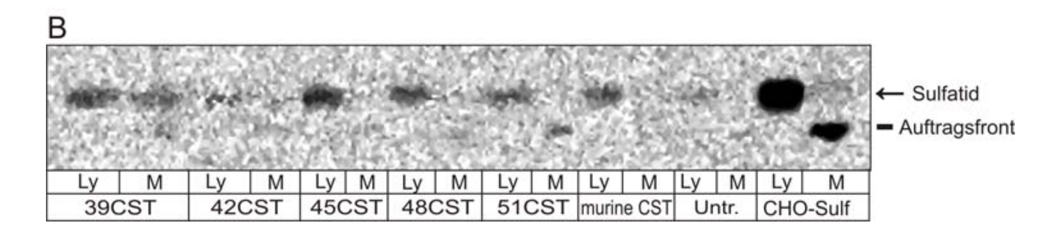


Abb. 3.29: Expression der CST-Konstrukte und deren Aktivitäts-Nachweis. CHO-K1-Zellen, die mit den fünf CST-Konstrukten transfiziert worden waren, wurden nach ca. 72 h für die Western-Blot-Analyse (A) und den Aktivitäts-Nachweis (B) aufbereitet. A: Die Proteine in dem Gesamt-Zelllysat (Ly) und dem Kulturüberstand (Medium – M) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (jeweils 1/10 vom Gesamtvolumen aufgetragen) und die CST mit dem ST2 Antiserum (1:5000) detektiert. Das Molekulargewicht der CST beträgt ca. 54 kDa.
B: Die Aliquots, 10 μl des Kulturüberstands und 10 μl des Zelllysates (5 µg Protein) wurden mit [^{35}S]PAPS und Galaktocerebrosid im Standard-CST-Assay inkubiert. Das Sulfatid wurde mittels HPTLC aufgetrennt und durch den Gebrauch des PhosphoImager nachgewiesen. Als positive Kontrolle dienten die Wildtyp-CST und CHO-Sulf-Zellen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Expression der \`verkürzten´ CST´s in den Zellen nicht den gewünschten Effekt hatte, größere Mengen in den Kulturüberstand zu sezernieren, wurden weitere Fusions-Konstrukte erstellt. Diesbezüglich wurden Plasmide konstruiert, welche zur Expression der Fusionsproteine AChE-Furin-lCST und -Seap-Furin-lCST führten. Diese Zusätze an die lösliche CST (ohne Transmembran Domäne), wie die vollständigen Proteine AChE (Acetylcholinesterase) und Seap (sekretorische alkalische Phosphatase) wurden gewählt, da von ihnen bekannt ist, dass sie in den Kulturüberstand sezerniert werden. Zusätzlich war eine Furinschnittstelle zwischen AChE bzw. Seap und CST eingebaut. Dies diente dazu, das Furin als Endoprotease an dieser Schnittstelle, AChE bzw. Seap von der CST intrazellulär abspaltet und somit kein Fusionsprotein mehr vorliegt.
Diese Konstrukte wurden ebenso auf Expression und Sekretion hin untersucht. Als positive Kontrolle dienten wiederum CHO-Sulf-Zellen wie auch das Konstrukt mit der löslichen verkürzten CST (s.o.), 39CST. Wie in der Abbildung 3.30 zu sehen ist, werden die verschiedenen Fusionsproteine in den transfizierten Zellen exprimiert, jedoch war keine Sekretion in den Kulturüberstand bei AChE-lCST und Seap-lCST zu erkennen. Es hat somit

keine wesentliche Verschiebung des Proteins in den Kulturüberstand stattgefunden und der Großteil der Proteine verblieb weiterhin in der Zelle.

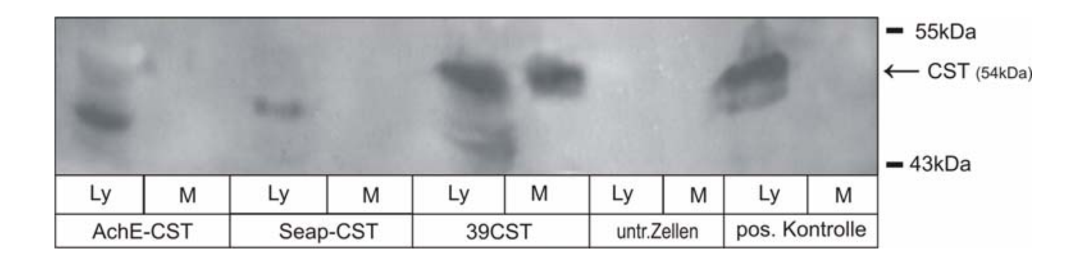


Abb. 3.30: Expressions-Nachweis der Fusionsproteine im Lysat von CHO-K1-Zellen. 72 h nach der Transfektion wurde Lysat aus den transient transfizierten Zellen hergestellt und je Spur 1/10 des Gesamtvolumens vom Kulturüberstand (Medium-M) und dem Lysat (Ly) aufgetragen. Die Detektion der CST erfolgte mit dem ST2-Antiserum (1:5000), das die CST erkennt, welche ein Molekulargewicht von ca. 54 kDa hat.

3.3.2 Analyse von MAL und PLP als mögliche Transporter der CST

Die vorangegangen Untersuchungen zeigten, dass das lösliche Enzym CST zum größten Teil in der Zelle verbleibt und nicht in den Zellkultur-Überstand sezerniert wird, obwohl verschiedene Fusions-Konstrukte erstellt worden sind. Es stellt sich nun die Frage, ob es einen Faktor gibt, der das Enzym in der Zelle zurückhält. Möglicherweise wird ein weiteres Protein für den Transport benötigt. Denkbare Transport-Lipoproteine, die bereits in der Literatur beschrieben worden sind, sind zum einen das Proteolipidprotein (PLP) und das Myelin und Lymphozyt Protein (MAL).

Anhand von Immunfluoreszenz-Untersuchungen sollte getestet werden, ob eine Co-Transfektion von MAL bzw. PLP mit CST eine Co-Lokalisation hervorruft. Dazu wurden die codierende Sequenz von PLP bzw. MAL mit einem C-terminalen HA-Markierung in den pcDNA3-Vektor kloniert und dieses Fusionsprotein zusammen mit der CST transfiziert. Die CST wurde mit dem ST2-Antiserum und die Fusionsproteine über die HA-Markierung in der Immunfluoreszenz detektiert. Zur genaueren Bestimmung der Lokalisation wurden die MAL- und PLP-kodierenden Plasmide sowohl in CHO-K1-Zellen wie auch in die stabile CST-Zelllinie 39CST-CHO transfiziert (Abs. 3.3.1).

In der Abbildung 3.31 A ist zunächst die CST mit einem grün fluoreszierenden sekundären Antikörper nachgewiesen. In den folgenden Bildern ist das Fusions-Protein MAL-HA in CHO-K1-Zellen (B) und in der stabilen 39CST-CHO-Zelllinie (C) mit Hilfe des 12CA5-Antikörpers gegen die HA-Markierung gezeigt. In den unteren Bildern sind die Co-Färbungen

des MAL-HA-Proteins mit der CST gezeigt. Zuerst ist die Co-Färbung von MAL-HA in der stabilen CST-Zelllinie gezeigt (D) und dann folgt die Co-Färbung von MAL-HA co-transfiziert mit dem 39CST-Protein in CHO-K1-Zellen (E).
Diese Versuche wurden ebenfalls mit PLP durchgeführt. Zunächst ist in der Abbildung 3.32 wieder die CST nachgewiesen (A), dann das PLP-HA-Protein in den CHO-K1- (B) und in den 39CST-CHO-Zellen (C). Ebenso wurde eine Co-Transfektion von PLP-HA mit 39CST durchgeführt. In D ist die Färbung von PLP-HA in den 39CST-CHO-Zellen zu sehen und in E die Co-Transfektion von PLP-HA und 39CST.
Sowohl bei der mit MAL wie auch bei der mit PLP durchgeführten Immunfluoreszenz zeigte sich, dass es zu keiner Veränderung der Lokalisation des CST-Proteins kommt. Die CSTbefindet sich im Endoplasmatischen Retikulum (ER), wie in den Abbildungen 3.31 & 3.32 zu sehen ist. Eine Co-Lokalisation von MAL bzw. PLP mit CST ist nicht zu beobachten. Somit kommen diese Proteine nicht als mögliche Transporter-Faktoren für die CST in Frage.

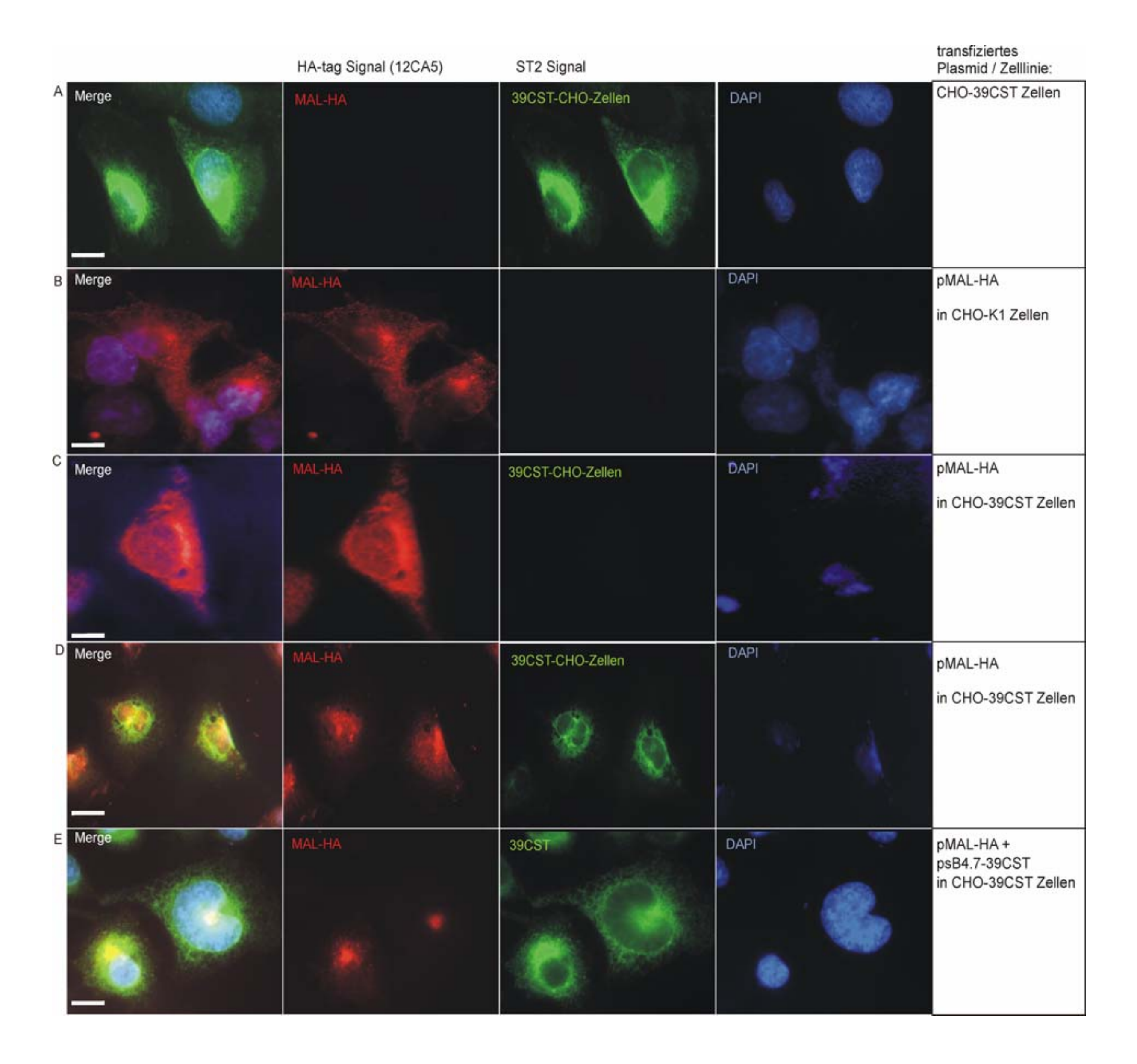


Abb. 3.31: Co-Färbung der CST mit MAL-HA in CHO-K1- und 39CST-CHO-Zellen. A zeigt die mit der 39CST stabil transfizierten Zellen (39CST-CHO), in denen die CST mit dem - Antiserum (grün; 1:500) gefärbt ist. B-C ist die Expression von MAL-HA (12CA5-Antikörper gegen die HA-Markierung; rot; 1:500) jeweils in CHO-K1- (B) und in 39CST stabil transfizierten CHO-Zellen (C) dargestellt. D-E zeigen eine Doppelfärbung des Fusionsproteins MAL-HA in der 39CST-CHO-Zelllinie (D), in der die CST mit dem Antiserum ST2 angefärbt ist. E zeigt eine Co-Transfektion von MAL-HA und 39CST in CHO-K1-Zellen. Die Überlagerung der einzelnen Bilder ist mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung (1:500) erkennbar. Maßstabsbalken: 20 µm. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Versuchen. 39CST entspricht dem Konstrukt, 39CHO-Zellen der stabilen Zelllinie.

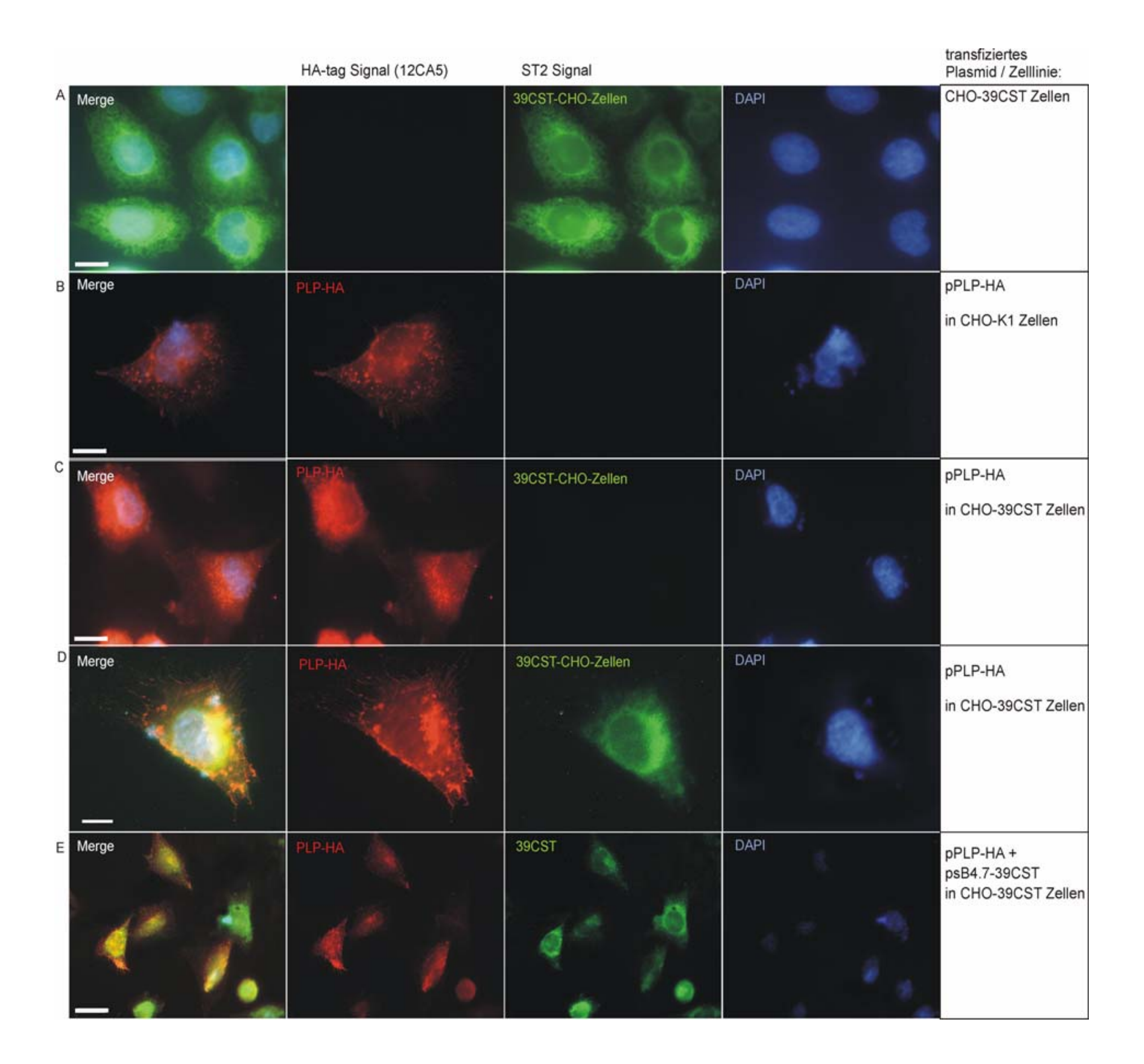


Abb. 3.32: Co-Färbung der CST mit PLP-HA in CHO-K1- und 39CST-CHO-Zellen. A zeigt die mit der 39CST stabil transfizierten Zellen (39CST-CHO), in denen die CST mit dem ST2-Antiserum (grün; 1:500) gefärbt ist. B-C ist die Expression von PLP-HA (12CA5-Antikörper gegen die HA-Markierung; rot; 1:500) jeweils in CHO-K1- (B) und in 39CST stabil transfizierten CHO-Zellen (C) dargestellt. D-E zeigen eine Doppelfärbung des Fusionsproteins PLP-HA in der stabilen 39CST-CHO-Zelllinie (D), in der die CST mit dem Antiserum ST2 angefärbt ist. E zeigt eine Co-Transfektion von PLP-HA und 39CST in CHO-K1-Zellen. Die Überlagerung der einzelnen Bilder ist mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung (1:500) erkennbar. Maßstabsbalken: 20 µm. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Versuchen. 39CST entspricht dem Konstrukt, 39CHO-Zellen der stabilen Zelllinie.

Neben der Immunfluoreszenz-Untersuchung wurde ebenfalls eine Western-Blot-Analyse durchgeführt, um festzustellen, ob beide Proteine, PLP (34 kDA) und MAL (17 kDa) mit der richtigen Größe exprimiert wurden. Die Inkubation mit dem ST2-Antiserum führte zur Detektion der CST, ein ca. 54 kDA großes Protein, und über den 12CA5-Antikörper von PLP,

das ca. 34 kDa groß ist. Die Western-Blot-Membran wurde mit beiden Antikörpern zusammen inkubiert. Allerdings konnte MAL nicht detektiert werden.

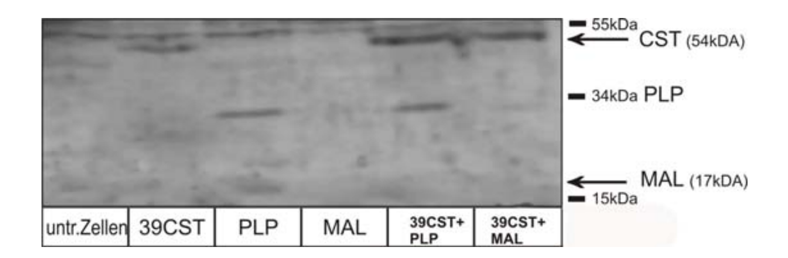


Abb. 3.33: Expression der CST, MAL und PLP. 48 h nach Transfektion wurde Zelllysat aus den unterschiedlich transient transfizierten Zellen hergestellt und je Spur 50 µg Protein aufgetragen. Die Detektion der CST erfolgte mit dem ST2-Antiserum (1:5000) und des PLP-HA mit dem 12CA5-AK (10 µg/ml), der das Fusionsprotein anhand der HA-Markierung erkennt. PLP-HA hat rechnerisch ein Molekulargewicht von 34 kDa. In der ersten Spur wurde das Lysat der untransfizierten CHO-K1-Zellen aufgetragen, in der zweiten und dritten Spur CHO-K1-Zellen transfiziert mit PLP-HA und MAL-HA, in der vierten Bahn CHO-K1-Zellen transfiziert mit PLP-HA und CST sowie in der letzen Bahn CHO-K1-Zellen transfiziert mit CST und MAL-HA.

3.3.3 Export- und Lokalisations-Untersuchung an dem Fusionsprotein DPPIV(TM)-39CST

Um festzustellen, ob für den Export der CST der luminale Teil der CST oder eher die Transmembran-Domäne verantwortlich ist, wurde ein CST-Plasmid hergestellt, in dem die CST an eine Domäne eines Proteins fusioniert wird, von dem bekannt ist, dass es an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Hierfür wurde die amino-terminale-Domäne der Transmembran-Domäne (TM) des Plasmamembran-Proteins Dipeptidylpeptidase (DPPIV) verwendet. Die DPPIV ist ein Typ II-Transmembran Protein und wird den Exopeptidasen zugeordnet. Von Munro (1995) wurde gezeigt, dass Lysozym nach Kopplung an die TM-Domäne der DPPIV zur Plasmamembran transportiert wurde. Zusammen mit der löslichen Form der 39CST und einer HA-Markierung wurde daher ein Plasmid konstruiert, das das Fusionsprotein DPPIV (TM)-39CST-HA kodiert (siehe Plasmidkarte im Anhang). Durch dessen Lokalisations-Bestimmung (mit Hilfe von Immunfluoreszenz) ist möglicherweise eine Aussage zu machen, ob der luminale Teil der CST für die Retention im ER verantwortlich ist.

Zunächst erfolgte ein Expressions-Nachweis über Western-Blot-Analyse mit Hilfe des ST2-Antiserums und dem 12CA5-Antikörper. Als positive Kontrollen dienten zum einen das Zelllysat einer Überexpression HA-markierter muriner CST (CST-HA) aus CHO-K1 Zellen und zum anderen ein Lysat von den CHO-Sulf-Zellen.

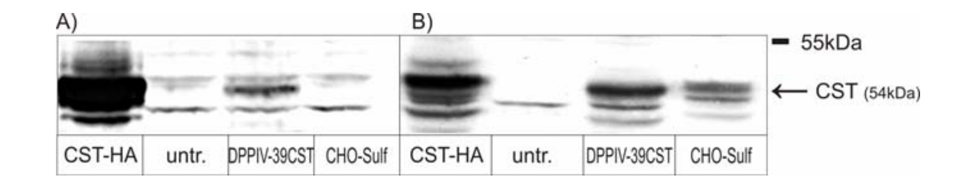
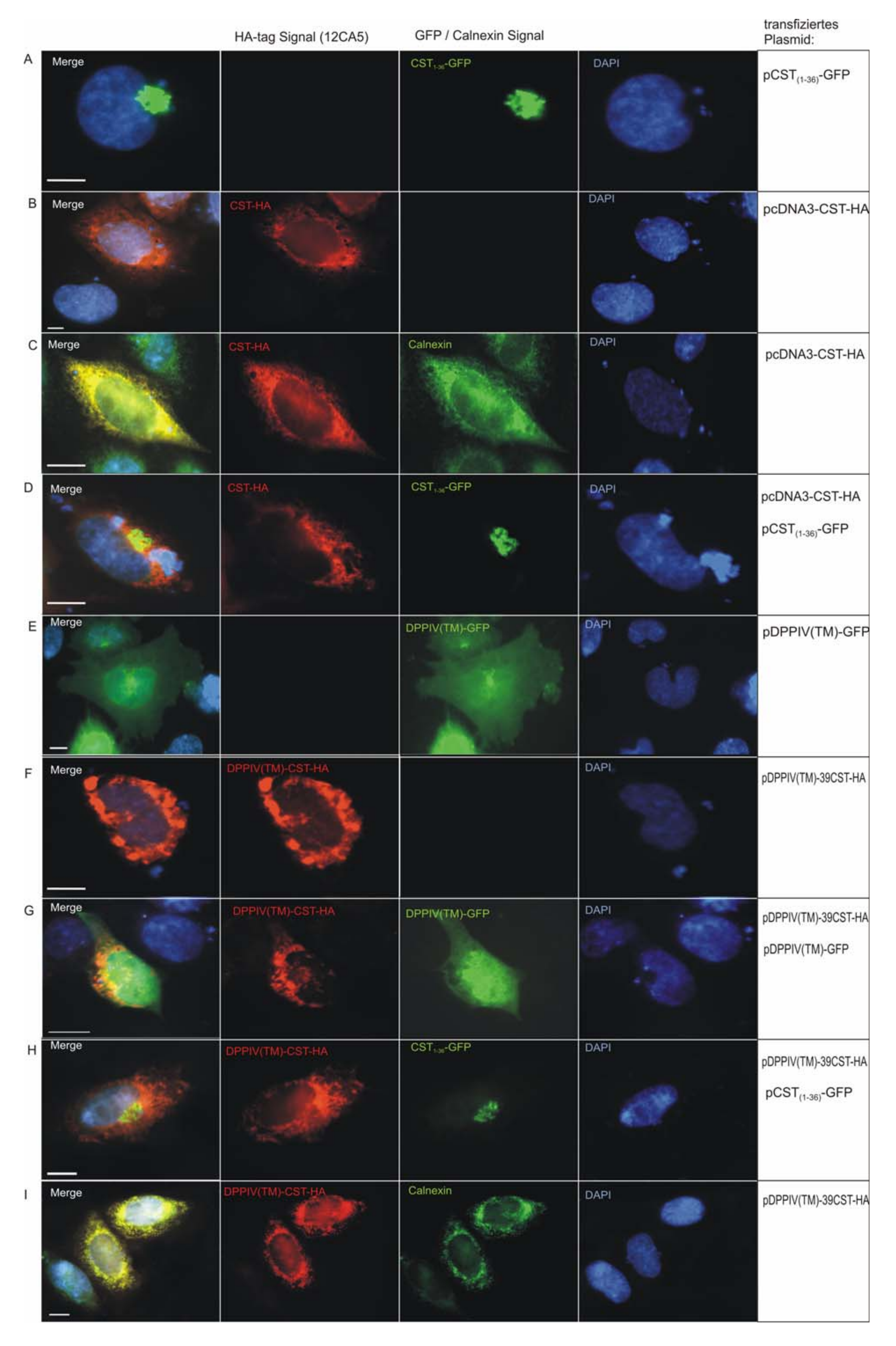


Abb. 3.34: Expressions-Nachweis der DPPIV(TM)-39CST-HA in CHO-K1 Zellen. 48 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen lysiert und je Spur 50 µg Protein aufgetragen. Der Nachweis der DPPIV(TM)-lCST-HA erfolgte zum einen mit dem 12CA5-AK (gegen die HA-Markierung; 1 µg) (A) und zum anderen mit dem ST2-Antiserum (1:5000) (B). Als positive Kontrollen dienten die murine CST-HA und CHO-Sulf-Zellen.

Sowohl mit dem ST2-Antiserum wie auch mit dem Antikörper gegen die HA-Markierung konnte die DPPIV(TM)-39CST-HA auf Expressionsebene nachgewiesen werden.
Um zu überprüfen, ob es zum Transport an die Plasmamembran kommt, wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Mit einem Antikörper gegen Calnexin, das im ER lokalisiert ist, und mit dem Konstrukt $CST_{1\text{-}36}$-GFP, dass als Golgi-Marker dient, wurde eine genaue zelluläre Lokalisation des Proteins ermöglicht. In Yaghootfam et al. (2007) wurde gezeigt, dass das $CST_{1\text{-}36}$-GFP-Fusionsprotein, das lediglich aus den ersten N-terminalen 36 Aminosäuren der CST (die die Transmembran-Domäne beinhaltet) mit einem GFP-Tag besteht, spezifisch im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Zusätzlich wurde ein Fusionsprotein erzeugt, das aus der TM-Domäne des DPPIV und einem GFP-Signal besteht. Dies wurde als Plasmamembran-Marker eingesetzt. Um eine Vergleichsmöglichkeit im Bezug auf die Lokalisation der CST zu haben, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenz-Färbung mit CST-HA als Kontrolle durchgeführt. In Abbildung 3.35 B ist eine deutliche Co-Lokalisation der CST-HA mit Calnexin zu sehen. Zur besseren Darstellung des jeweiligen Lokalisation-Orts der überexprimierten Proteine wurden diese für sich allein in der Abbildung 3.35 aufgeführt.



HA-tag Signal (12CA5)
GFP / Calnexin Signal
transfiziertes Plasmid:
A
Merge
CST1-36-GFP
DAPI
pCST(1-36)-GFP
B
Merge
CST-HA
DAPI
pcDNA3-CST-HA
C
Merge
CST-HA
Calnexin
DAPI
pcDNA3-CST-HA
D
Merge
CST-HA
CST1-36-GFP
DAPI
pcDNA3-CST-HA
pCST(1-36)-GFP
E
Merge
DPPIV(TM)-GFP
DAPI
pDPPIV(TM)-GFP
F
Merge
DPPIV(TM)-CST-HA
DAPI
pDPPIV(TM)-39CST-HA
G
Merge
DPPIV(TM)-CST-HA
DPPIV(TM)-GFP
DAPI
pDPPIV(TM)-39CST-HA
pDPPIV(TM)-GFP
H
Merge
DPPIV(TM)-CST-HA
CST1-36-GFP
DAPI
pDPPIV(TM)-39CST-HA
pCST(1-36)-GFP
I
Merge
DPPIV(TM)-CST-HA
Calnexin
DAPI
pDPPIV(TM)-39CST-HA

Abbildung 3.35 I zeigt eine deutliche Co-Lokalisation von DPPIV(TM)-39CST-HAund dem ER Protein Calnexin in transient transfizierten CHO-K1-Zellen. Weitere Aufnahmen zeigten, dass wie bei der CST-HA keine Anreicherung des Proteins im Golgi-Apparat festzustellen ist. Ebenso konnte keine Co-Lokalisation zwischen der DPPIV(TM)-GFP und dem DPPIV(TM)-39CST-HA ermittelt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der aus den vorherigen Versuchen erhaltenden Daten wird deutlich, dass ein starkes ER-Rückhaltesignal, das sich anscheinend in der katalytischen Domäne der CST befindet, vorhanden ist. Das Entfernen der Membran Domäne, sowie der Austausch der Domäne mit vollständigen sekretorischen Proteinen (z.B. AChE, Seap) bzw. Membran Domänen (z.B. DPPIV), bewirkte keine Veränderung der zellulären Lokalisation.

Abb. 3.35: Subzelluläre Lokalisation des DPPIV(TM)-39CST-HA in CHO-K1-Zellen. A: zeigt die Golgi-Lokalisation von CST_{1-36}-GFP. In B ist CST-HA zu sehen. C-D sind Doppelfärbungen in CHO-K1-Zellen von CST-HA (rot) mit Calnexin (grün)-C sowie CST_{1-36}-GFP (grün)-D. E zeigt das Fusionsprotein DPPIV-GFP und F: DPPIV-lCST-HA (rot). G-I zeigt die Doppelfärbung von DPPIV(TM)-lCST-HA (rot) mit DPPIV(TM)-GFP (G), mit CST_{1-36}-GFP (H) und mit dem ER-Marker Calnexin (I). Maßstabsbalken = 20 µm. Die Überlagerung der einzelnen Bilder ist zusätzlich mit DAPI-Kernfärbung (1:500) zu erkennen. Antikörper-Verdünnung: Calnexin 1:300, 12CA5 1:500. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier Versuchen.

3.3.4 Subzelluläre Lokalisation der humanen Gal3-Sulfotransferase 1, 2 und 4

Aufgrund der Tatsache, dass die CST in der Zelle verbleibt und hauptsächlich im ER lokalisiert ist, wurde untersucht, ob zu der CST homologe Sulfotransferasen, bei einer Überexpression ebenso im ER verbleiben.

Die Familie der humanen Galaktose 3-0-Sulfotransferasen (Gal3ST) besteht aus vier Mitgliedern: Gal3ST1 (Galaktose-3-O-Sulfotransferase 1; humane CST), Gal3ST2 (galβ-3GalNAc -3-O-Sulfotransferase 2), Gal3ST3 (galβ-3GalNAc 3'-Sulfotransferase 3) und Gal3ST4 (galβ-3GalNAc 3'-O-Sulfotransferase). Diese vier sind verantwortlich für die Sulfatierung von verschiedenen Akzeptor-Substraten. Sie katalysieren den Transfer von Sulfat auf die C-3-Position des jeweiligen Substrates. GalCer und LacCer sind die Substrate von Gal3ST1, N-3-Acetylgalaktosamin für Gal3ST2, N-3-Acetylgalaktosamin für Gal3ST3, und N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalaktosamin für Gal3ST4 (Seko et al., 2001)

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation der humanen Sulfotransferasen, wurden Gal3ST1, Gal3ST2 und Gal3ST4 mit einer HA-Markierung versehen (siehe Plasmidkarte im Anhang). Als positive Kontrolle wurde das Fusionsprotein CST-HA eingesetzt. Zunächst wurde mittels Western-Blot-Methode die Expression der Sulfotransferasen nachgewiesen. Dazu wurden Zelllysate aus den transfizierten CHO-K1 Zellen nach 48 h hergestellt. Die HA-markierten Proteine wurden mit dem 12CA5-Antikörper nachgewiesen. Es konnte von allen drei Sulfotransferasen eine Proteinexpression festgestellt werden (Abb. 3.36). Das schwächere Signal bei der Gal3ST2 stammt von einer geringeren Expressionsrate und konnte auch bei den Immunfluoreszenz-Untersuchungen beobachtet werden.

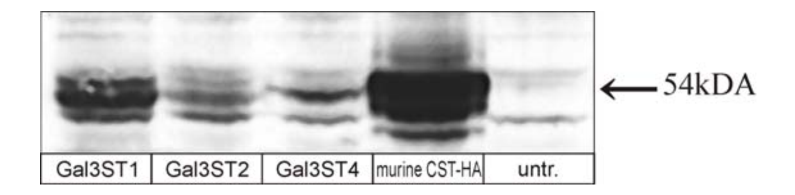


Abb. 3.36: Western-Blot-Nachweis der humanen Sulfotransferasen Gal3ST1, Gal3ST2 und Gal3ST4. 48 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen isoliert und je Spur 50 µg Protein aufgetragen. Der Nachweis der Gal3ST-Konstrukte erfolgte wie in A zu sehen mit dem 12CA5-Antikörper (gegen die HA-Markierung; 10 µg/ml) gezeigt. Als positive Kontrolle diente CST-HA.

Im Anschluss daran erfolgte eine Immunfluoreszenz-Analyse, um festzustellen, wo die Sulfotransferasen in der Zelle lokalisiert sind. Dafür wurden die Fusionsproteine Gal3ST1-HA, Gal3ST2-HA und Gal3ST4-HA in CHO-K1-Zellen transfiziert. Zur genaueren

Bestimmung der Lokalisation wurden Co-Färbungen mit Calnexin, das im ER lokalisiert ist, und mit dem Konstrukt CST_{1-36}-GFP, das als Golgi-Marker dient, durchgeführt.
In Abbildung 3.37 sind beispielhaft die verschiedenen Doppelfärbungen dargestellt. Die transient transfizierten Gal3ST-HA Fusionsproteine wurden mit Anti-HA-Antikörper und einem rot-fluoreszierenden Zweitantikörper angefärbt, während die Färbung des ER–Proteins mit einem grün-fluoreszierenden Zweitantikörper erfolgte. Die Golgi-Färbung ist mittels des GFP-Signals des Konstrukt CST_{1-36}-GFP sichtbar. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse zeigen, dass alle drei untersuchten Sulfotransferasen Gal3ST(1, 2, 4)-HA im ER lokalisiert sind (Abb. 3.37 C, E, G). Eine Lokalisation im Golgi Apparat ist nur zum Teil vorhanden (Abb. 3.37 B, D, F). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass nicht nur die CST im ER zurückgehalten wird, sondern dies auch bei den ähnlich aufgebauten Sulfotransferasen der Fall ist.
Die Ergebnisse lassen zusammengefasst vermuten, dass es noch einen weiteren entscheidenden Faktor gibt, der für einen Weitertransport der Sulfotransferasen nötig ist.

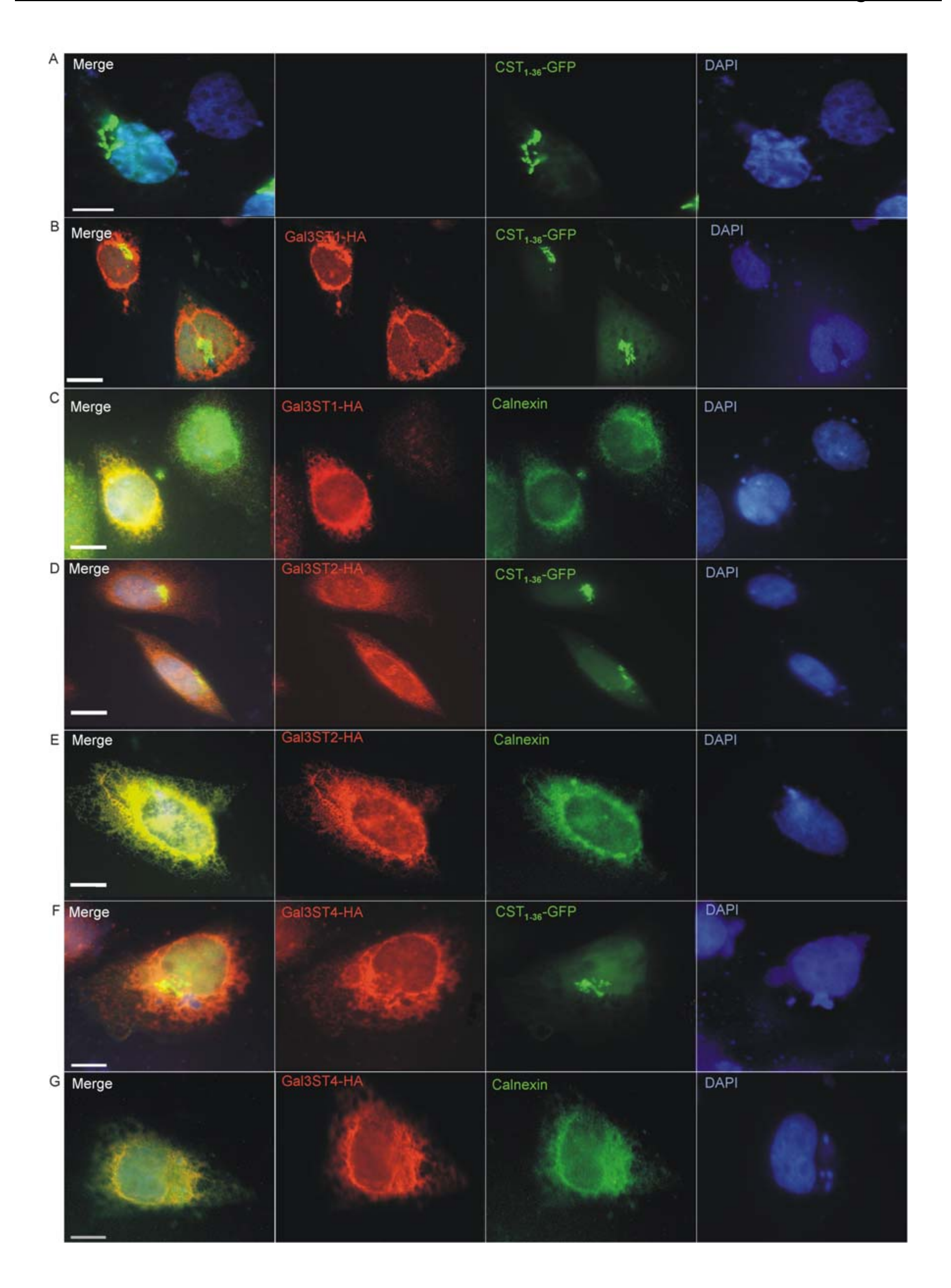


Abb. 3.37: Co-Färbung der humanen Sulfotransferasen Gal3ST1, Gal3ST2 und Gal3St4 mit ER- und Golgi-Proteinen. A: Golgi-Lokalisation von CST_{1-36}-GFP. In B-G sind die Doppelfärbungen in CHO-K1-Zellen von Gal3ST1-HA (rot) und CST_{1-36}-GFP(grün)-B sowie Calnexin (grün)-C, D-E zeigt dies für Gal3ST2-HA, F-G für Gal3ST4-HA mit Calnexin (grün; G) und CST_{1-36}-GFP (grün; F). Maßstabsbalken= 20 µm. Die Überlagerung der einzelnen Bilder ist zusätzlich mit DAPI-Kernfärbung (1:500) zu erkennen. Antikörper-Verdünnung: Calnexin 1:300, 12CA5 1:500. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Versuchen.

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation der CST

Die biochemischen Untersuchungen sowie die Immunfluoreszenz-Analyse mittels verschiedenen subzellulären Markern zeigten, dass durch die Entfernung der Membran-Domäne und weitere Deletionen am N-Terminus der CST es zu keiner Sekretion in den Zellkultur-Überstand kam.

Es konnte zudem auch durch die Herstellung der Fusionsproteine AChE-Furin-lCST und Seap-Furin-lCST keine gesteigerte Sekretion in den Zellkultur-Überstand festgestellt werden.

Des Weiteren besitzen die Proteine PLP und MAL keinen Einfluss auf den Transport der 39CST aus dem ER.

Außerdem konnte keine Veränderung der Lokalisation des Fusionsproteins DPPIV(TM)-39CST-HA festgestellt werden.

Die homologen humanen Sulfotransferasen befinden sich ebenso wie die murine CST, bei einer Überexpression in der Zelle, zum größten Teil im ER.

4. Diskussion

"Lysosomale Speicherkrankheiten" sind zurückzuführen auf Defekte von lysosomalen und nicht-lysosomalen Proteinen, wodurch es zur Akkumulation von Komponenten (z. B. vom Proteinen und Lipiden) kommt, die normalerweise in den Lysosomen abgebaut werden. Besonders schwerwiegend ist die Akkumulation fehlerhaft abgebauter Proteine im Nervensystem, da eine Fehlfunktion des Nervensystems stets mehrere Körperfunktionen betrifft.

Eine bislang nicht behandelbare lysosomale Speicherkrankheit, die hauptsächlich das Nervensystem betrifft, ist die metachromatische Leukodystrophie (MLD). Die Funktionsschädigung liegt hierbei im lysosomalen Enzym Arylsulfatase A (ASA), das am Abbau von 3-O-Sulfogalactosylceramid (Sulfatid) beteiligt ist. Sulfatid ist ein polares Glykolipid, das hauptsächlich in der Myelin-Scheide des Nervensystems vorkommt. Aufgrund der ASA-Defizienz kommt es zu einer Akkumulation von Sulfatid in den Lysosomen, wodurch eine progressive Demyelinisierung und des Weiteren charakteristische neurologische Symptome auftreten.

Durch diese Arbeit sollten mit Hilfe verschiedener Maus-Modelle weitere Einblicke in die MLD erhalten werden. Hierbei galt der Aufklärung der Effekte durch Sulfatid-Akkumulation ein besonderes Interesse.

4.1 Sulfatid-Akkumulation in Neuronen von ASA- und ASA/ApoE-defizienten Mäusen

Zurzeit ist noch wenig bekannt, welchen Effekt eine erhöhte Sulfatid-Speicherung auf die verschiedenen Zell-Funktionen hat. Durch die Herstellung eines ASA-defizienten Mausmodells (Hess et al., 1996) wurden neue Möglichkeiten geschaffen, die Speicherkrankheit auf zellulärer und molekularer Ebene zu studieren und zu verstehen. ASA-Knockout-Mäuse sind unfähig, Sulfatid abzubauen und weisen eine intralysosomale Lipidspeicherung auf. Die Lokalisation der Lipidspeicherung in den neuronalen und nicht-neuronalen Geweben der Mäuse ist vergleichbar mit der bei MLD-Patienten beschriebenen Lipidose (von Figura et al., 2001). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten am MLD-Mausmodell eine Sulfatid-Akkumulation in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen nachweisen (Molinder-Melin et al., 2004; Wittke et al., 2004). Außerdem zeigten die Purkinje- und Glia-Zellen im Kleinhirn morphologische Veränderungen (D´Hooge et al., 1999). Zudem wurde eine Demyelinisierung im akustischen Ganglion beobachtet, die im Alter von 6 bis 12 Monaten auftritt (D´Hooge et al. 1999a; Coeven et al., 2001). Erstaunlicherweise zeigen die ASA-Knockout-Tiere im Vergleich zu den MLD-Patienten aber einen wesentlich milderen Phänotyp. Die Mäuse haben eine normale Lebensdauer (vgl. Abb. 3.1) und zeigen auch keine weit verbreitete Demyelinisierung (Gieselmann et al., 1998). Sulfatid kommt zwar überwiegend in der Myelin-Scheide der Axone vor, seine *de novo*-Synthese erfolgt aber in den Oligodendrozyten (Svennerholm et al., 1992; Vos et al., 1990). Sulfatid wurde allerdings auch innerhalb von Neuronen gefunden (Raghavan & Kanfer, 1972; Wittke et al., 2004). Auf welche Weise Sulfatid zu den Neuronen gelangt oder ob es dort endogen synthetisiert wird, ist noch nicht geklärt. Han und Kollegen beschrieben in diesem Zusammenhang ein denkbares Modell, mit dem sie postulieren, dass der Transport von Sulfatid über das ApoE-enthaltende HDL-Lipoprotein (*high density lipoprotein-like lipoprotein*) erfolgt (Han et al., 2003 und 2007). ApoE-assoziierte Lipoprotein-Partikel werden von den Astrozyten freigegeben und nehmen nach diesem Modell Sulfatid von der Myelin-Scheide über einen sogenannten „*kiss and run*"-Mechanismus auf. Mittels Endozytose durch den überwiegend in den Neuronen exprimierten LDL (*low density lipoprotein*)–Rezeptor oder den LDL related-Protein-Rezeptor können die ApoE-assoziierten Lipoprotein-Partikel, die Sulfatid enthalten, in die Neuronen aufgenommen werden (Han et al., 2007; Cheng et al., 2008).

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Sulfatid-Akkumulation in den Neuronen von ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen. Dabei sollte genau untersucht werden, ob eine ApoE-Defizienz einen Effekt auf die neuronale Sulfatid-Anreicherung hat.
Die hierzu erzeugten Doppel-Knockout-Mäuse sollten im Vergleich mit ASA-Knockout-Mäusen Aufschluss darüber geben, ob der Sulfatid-Transport in die Neuronen mittels des ApoE-Proteins erfolgt.
Die Doppel-Knockout-Mäuse zeigten gegenüber ASA-Knockout-Mäusen keinen deutlichen Unterschied in der Lebenszeit. Jedoch war die maximale Lebenszeit bei beiden Knockout-Stämmen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren verkürzt. Wenige Tiere wurden älter als anderthalb Jahre. Die ApoE-Defizienz scheint dabei keine Auswirkungen auf den früheren Tod der Tiere zu haben, denn Kontrolltiere mit ApoE-Defizienz überleben im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ebenso lang.
Die Lipidanalyse des Gesamtgehirns und des Cortex mittels TLC ergab im Alter von einem Jahr zunächst keine relevante Erhöhung des Sulfatid-Gehalts in den ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen. Wie literaturgemäß zu erwarten war (Gieselmann et al., 1998; Yaghootfam et al., 2005), zeigte die Lipidanalyse des Cortex und des restlichen Gehirns bei ASA-Knockout-Mäusen im Alter von 18-24 Monaten einen signifikant erhöten Sulfatidgehalt. Dies wurde ebenfalls bei den ASA/ApoE-Knockout-Stämmen im Alter von 18-24 Monaten festgestellt. Ein wesentlicher Unterschied in der Sulfatidmenge zwischen ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen war jedoch nicht vorhanden. Um das in der Dünnschichtchromatographie erkennbare Sulfatid besser quantifizieren zu können, wurde die ESI-MS-Technik verwendet. Außerdem gab es Anhaltspunkte dafür, dass verschiedene Sulfatid-Spezies in unterschiedlichen Zellen vorkommen. So kommt Sulfatid mit kurzkettigen Fettsäuren verstärkt in Astrozyten und in Neuronen vor (Isaac et al., 2006), langkettiges Sulfatid hingegen im Myelin (Vos et al., 1994). Eine genaue Untersuchung mit Hilfe des ESI-MS konnte eine präzise Zusammensetzung der Sulfatid-Spezies und der Menge an Sulfatid in den beiden untersuchten Bereichen liefern. Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie konnten massenspektrometrisch bestätigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass C24:1-kettiges Sulfatid ebenso wie C18:0-kettiges Sulfatid im gesamten Gehirn signifikant erhöht waren. Aufgrund der wesentlich besseren Auftrennung der Sulfatidspezies mit Hilfe der ESI-MS-Technik war bereits im Alter von einem Jahr ein erhöhter Gehalt an C18:0-kettigem Sulfatid im Cortex festzustellen. Dazu ist es erwähnenswert, dass die subzelluläre Lokalisation der Glykosphingolipide ihre Fettsäuren-Kettenlänge bestimmt, d. h. die Zuckerreste bleiben stets konstant, wohingegen die Fettsäuren-Kettenlängen innerhalb

desselben Moleküls variieren können (Isaac et al., 2006). Das Sulfatid der Myelinscheiden hat beispielsweise mehrheitlich langkettige Fettsäuren (Vos et al., 1994). Daher könnte der erhöhte C24:1-Sulfatid-Wert im Cortex und im restlichen Gehirn bei den ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen aus dem Myelin stammen. Diese Vermutung wird bestätigt durch bereits durchgeführte Analysen an den ASA-Knockout-Mäusen, die zeigten, dass eine Akkumulation von Sulfatid im Myelin von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen zu finden ist (Coenen et al., 2001; Taylor et al., 2002; Saravanan et al., 2007). Passend hierzu wurde innerhalb von Astrozyten und Neuronen Sulfatid gefunden, das vorherrschend eine Stearinsäure (C18:0) besitzt (Bertson et al., 1998; Issac et al., 2002, Pernber et al., 2004). Dies und die Ergebnisse aus der ESI-MS lassen darauf schließen, dass der gemessene erhöhte C18:0-Sulfatid-Gehalt auf eine Akkumulation von Sulfatid innerhalb von Neuronen zurückzuführen ist. Verschiedene Studien an ASA-Knockout-Mäusen bestätigen diese Vermutung, denn immunhistochemische und histochemische Analysen zeigten eine massive Anreicherung an Sulfatid in Neuronen und auch in Astrozyten bei ASA-defizienten Mäusen. (Hess et al., 1996; Molander-Melin et al., 2004; Wittke et al., 2004, eigene Beobachtungen). Es ist daher davon auszugehen, dass ein großer Anteil des C18:0-kettigen Sulfatids von den Neuronen stammt und diese unter normalen Bedingungen Sulfatid selbst synthetisieren. Solange jedoch das entsprechende Abbau-Enzym, in diesem Fall ASA, vorhanden ist, kommt es nicht zu einer Sulfatid-Anreicherung. Indessen sollte jedoch berücksichtigt werden, dass kurzkettige Fettsäuren von Sulfatid in frühen Stadien der Myelinisierung zu finden sind (von Figura et al., 2001) und das Sulfatid mittels eines Transportproteins, z. B. durch das ApoE-Protein, zu den Neuronen transportiert werden könnte (Han et al., 2003 und 2007; Cheng et al., 2008). Die Daten zeigen aber deutlich, dass ebenfalls ein signifikant erhöhter Gehalt an C18:0-kettigem Sulfatid bei den ASA/ApoE-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen vorhanden war, aber kein wesentlicher Unterschied zu den ASA-Knockout-Mäusen besteht. Im Gegensatz zu Han (2004) konnte in der vorliegenden Arbeit im Cortex ein Jahr alter ApoE-Knockout-Mäuse keine Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes nachgewiesen werden. Sowohl der Sulfatid-Gehalt des Cortex, wie auch der des restlichen Gehirns zeigten bei den ApoE-Knockout-Mäusen keinen Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen. Auch konnte bei den Doppel-Knockout-Mäusen kein signifikanter Unterschied zu den ASA-Knockout-Mäusen im Cortex und im restlichen Gehirn nachgewiesen werden. Lediglich ein etwas geringerer C24:1-Sulfatid-Gehalt war bei den ASA/ApoE-Knockout-Mäusen festzustellen, obwohl eine Zunahme an Sulfatid erwartet wurde.

Die Resultate deuten darauf hin, dass ApoE keine wesentliche Rolle bei dem Transport von Sulfatid zu den Neuronen zukommt.

Die Intensität der Sulfatid-Akkumulation sowohl bei der humanen metachromatischen Leukodystrophie (MLD) und den ASA-Knockout-Mäusen variiert von einem Zelltyp zum anderen. Um zu bestätigen, dass Sulfatid tatsächlich in den Neuronen der ASA-Knockout-Maus und vor allem auch in der Doppel-Knockout-Maus angereichert ist, wurden immunhistochemische und histochemische Untersuchungen durchgeführt.
Durch verschiedene Studien sowie die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte Sulfatid-Speicherung in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns detektiert werden (Molinder-Melin et al., 2004; Wittke et al., 2004; diese Arbeit). Die Sulfatid-Akkumulation konnte durch eine histochemische Färbung mittels Alcianblau vor allem in der Medulla oblangata und der Pons (Wittke et al., 2004; diese Arbeit), sowie in einigen Bereichen des basalen Vorderhirns und des Mesenzephalons festgestellt werden (Wittke et al., 2004).
Desweiteren konnte Sulfatid in den Oligodendrozyten und Neuronen bei jungen Tieren, sowie in den aktivierten Mikroglia-Zellen bei den älteren Knockout-Tieren nachgewiesen werden.
Wegen des polyanionischen Charakters von Sulfatid-Aggregaten ist eine Färbung mit einem kationischen Farbstoff für deren histochemische Anfärbung besonders geeignet. Mit Hilfe von Alcianblau kann eine Anfärbung von sulfatierten Komponenten erreicht werden (Schott et al., 2001). Die Sulfatid-Anreicherung wurde zunächst so durch die Alcianblau-Färbung eingefärbt, wie sie auch bei Lüllmann-Rauch et al. (2001) beschrieben ist. Im Anschluß an diese Färbung wurde mit spezifischen Antikörpern, die gegen die Neuronen-spezifischen Proteine HRP-3, NSE und ß-III-Tubulin gerichtet waren, der Nachweis für die Sulfatid-Akkumulation in den neuronalen Zellen erbracht.
Vor allem in den Bereichen der Medulla oblongata und der Pons sowie im Cortex konnte bei den ASA-Knockout- und bei den Doppel-ASA/ApoE-Knockout-Mäusen bereits im Alter von einem Jahr Sulfatid-Akkumulation nachgewiesen werden. In der Medulla oblongata wurde eine verstärkte Zunahme an Sulfatid-akkumulierenden Neuronen bei beiden Knockout-Maus-Stämmen im Alter von 18-24 Monaten festgestellt. Diese Ergebnisse wurden auch mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen bestätigt. Unter Einsatz des SulphI-Antikörpers, der spezifisch an Sulfatid bindet (Fredmann et al., 1988), wurde eine Zunahme an Sulfatid-positiven Neuronen bei beiden Knockout-Stämmen beobachtet. ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Tiere zeigten eine ähnliche Verteilung der angefärbten Zellen in den untersuchten Hirnbereichen sowie eine ähnliche Farbintensität.

Vergleicht man die Resultate der histologischen Untersuchung mit denen der Lipidanalyse, läßt sich zusammenfassend sagen, dass ApoE keinen nennenswerten Anteil am Transport von Sulfatid zu den Neuronen hat, denn zum einen weisen die ApoE-Knockout-Mäuse keinen wesentlichen Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen auf, zum anderen zeigen die ASA/ApoE-Doppel-Knockout-Mäuse keinen entscheidenden Unterschied zu den ASA-Knockout-Tieren. Beide besitzen eine erhöhte Menge an C18:0-Sulfatid und zeigen Sulfatid-angereicherte Neuronen im Cortex und der Medulla oblongata.

Im Umkehrschluss könnte dies jedoch bedeuten, dass die lysosomale Speicherung in den Neuronen aus dem intra-neuronalen Sulfatid-Umsatz selbst stammt. Die quantitativen Unterschiede zwischen den Gehirn-Bereichen lassen vermuten, dass der Sulfatid-Gehalt innerhalb der jeweiligen Neuronen unterschiedlich ist.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das Sulfatid auf anderen Wegen zu den Neuronen transportiert wird. Eine Möglichkeit wäre die lysosomale Exozytose. Es wurde gezeigt, dass Lysosomen sezerniert werden (Reddy et al., 2001; Gerasimenko et al., 2001). Anhand von Studien an primären Nieren-Zellen der ASA-Knockout-Maus wurde belegt, dass Lysosomen die Sulfatid-Anreicherung aufweisen, durch Ca^{2+}-Stimulation sezerniert werden (Klein et al., 2004). Bei MLD-Patienten wurde bereits extrazelluläres Sulfatid im Urin und auch in der Zerebrospinalflüssigkeit gefunden (von Figura et al., 2001). Somit wäre durchaus die Möglichkeit gegeben, dass Sulfatid durch lysosomale Sekretion zu anderen Zellen wie z. B. Neuronen gelangt, und dort wiederum Sulfatid-Anreicherungen verursachen kann.

Des Weiteren ist der Transport von Sulfatid zu den Neuronen mit Hilfe von Exosomen möglich. Exosomen sind endosomal-abgeleitete Mikrovesikel und wurden erstmals durch Pan und Kollegen beschrieben. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Entfernung von unnötigen Membranbestandteilen während der Entwicklung von Retikulozyten (Pan et al., 1985). Weitere Untersuchungen ergaben, dass Exosomen ebenfalls für die interzelluläre Kommunikation verantwortlich sind, indem sie den Transfer von Molekülen von einer Zelle zur anderen ermöglichen. Interessanterweise sezernieren auch myelinisierende Oligodendrozyten Exosomen in einer Ca^{2+}-abhängigen Art und Weise. Diese Exosomen enthalten neben den wichtigsten Myelin-Faktoren wie MBP (Myelin und Lymphozyten Protein) und PLP (Proteolipid Protein), auch die Myelin-Lipide GalCer und Sulfatid (Krämer-Albers et al., 2007). Überschüssige Myelin-Komponenten werden über Exosomen-Transport ausgeschieden. In gleicher Weise könnte man die Abgabe von Membran-Bestandteilen des endosomalen Kompartiments über Exosomen als eine Art Hilfe ansehen, mit der sich die Oligodendrozyten vor der schädlichen Wirkung einer Überproduktion oder Akkumulation

durch ein Abbau-Defizit von Myelin-Komponenten wie Sulfatid bewahren. Auf diese Weise wäre es möglich, dass Oligodendrozyten der ASA-Knockout-Mäuse oder der MLD-Patienten das angereicherte Sulfatid über die Exosomen sezernieren. Über Exosomen sezerniertes Sulfatid könnte wiederum über Phagozytose von Neuronen aufgenommen werden, so dass es zu der beschriebenen Anreicherung von Sulfatid in den Neuronen kommt.

Ob neuronales Sulfatid nun durch Neuronen endogen synthetisiert wird, oder über extrazelluläre Wege in die Neuronen gelangt, konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings spricht der erhöhte C18:0-kettige Sulfatid-Wert bei den Knockout-Stämmen für eine Anreicherung von endogen synthetisiertem Sulfatid in den Neuronen, da kurzkettiges Sulfatid spezifisch für Neuronen ist (Issac et al., 2006; Pernber et al., 2004).

Des Weiteren bleibt unklar, welche neurologischen Konsequenzen die Sulfatid-Akkumulation in Neuronen haben könnte. So zeigen transgene CGT-Mäuse, welche die Cerebrosid-Galaktosyltransferase unter dem neuronalen Promotor Thy-1 exprimieren, zum einen einen erhöhten Gehalt an C18:0-kettigem Sulfatid und zum anderen audiogene Anfälle.

Die funktionellen Konsequenzen neuronaler Sulfatid-Anreicherung lassen verschiedene Spekulationen zu. Über ASA-Knockout-Mäuse wurde berichtet, dass neuromotorische Defizite, Lernbehinderung und mit fortgeschrittenem Alter auch Tremor auftreten (D´Hooge et al., 1999 und 2001; Hess et al., 1996). Es ist schwierig zu sagen, wie und in welchem Umfang diese funktionellen Defekte direkt den spezifischen Regionen des Gehirns zugeschrieben werden können, da die Sulfatid-Anreicherung in vielen Zelltypen vorkommt und die Neuronen auf allen Ebenen des ZNS vom Cortex bis zu den efferenten Nervenzellen beeinflusst.

Die Akkumulation von Sulfatid ist nicht nur auf die lysosomalen Kompartimente beschränkt, sondern wurde ebenso im Myelin (Saranvan et al., 2004) und in Neuronen (Pernber et al., 2002; Wittke et al., 2004; Molander-Melin et al., 2004) beobachtet, wo sich das Sulfatid in der Plasmamembran befindet. Es stellt sich nun die wichtige Frage, in welchem Umfang die intrazelluläre lysosomale Speicherung oder die erhöhte Menge an Sulfatid in der Plasmamembran in die Pathogenese der MLD-Krankheit involviert ist. Insofern wird es als wesentlich befunden, fortführende Studien der Neuronen anzuschließen, um weitere Einblicke in die Lipidzusammensetzung und Funktion von Sulfatid in der Plasmamembran zu erhalten.

4.2 Analyse der Thy-1 CGT-Mäuse: C18-langkettiges Sulfatid löst letale audiogene Anfälle in transgenen Thy-1 CGT-Mäusen aus

Sofern es das Muster der Lipidspeicherung betrifft, ähnelt das ASA-defiziente Maus-Model der humanen Metachromatischen Leukodystrophie (Wittke et al., 2004). Allerdings entwickeln die Mäuse nicht die schwerwiegenden neurologischen Symptome wie es im fortgeschrittenen Stadium der humanen Krankheit der Fall ist (Gieselmann et al., 1998).
Die Sulfatid-Akkumulation ist nicht nur auf die Oligodendrozyten und Schwann-Zellen beschränkt, sondern wurde ebenfalls in anderen Glia-Zellen und in Neuronen gefunden (von Figura et al., 2001; Pernber et al., 2002; Isaac et al., 2006). Jedoch ist die physiologische Rolle von Sulfatid in diesen Zellen noch völlig unbekannt. Die Sulfatid-Anreicherung in den Neuronen könnte in die Pathogenese der MLD involviert sein. Es ist z. B. bekannt, dass sich bei MLD im Nerven-System Sulfatid-Anreicherungen in den myelinisierenden Zellen und in Makrophagen befinden, die Myelin-Ablagerungen aufgenommen haben. Außerdem wurde bei MLD-Patienten (wie bei den ASA-defizienten Mäusen) ebenfalls eine Anreicherung von Sulfatid in Neuronen gefunden (Wittke et al., 2004; Molander-Melin et al., 2004).
MLD-Patienten mit spät infantiler und adulter Form der MLD leiden oft an epileptischen Anfällen (Wang et al., 2001). Auslöser hierfür könnte zum einen die Demyelinisierung des zentralen Nervensystems sein. Zum anderen könnten die Anfälle auch das Produkt einer neuronalen Fehlfunktion aufgrund eines erhöhten Sulfatid-Gehalts in der Plasmamembran der Neuronen sein. Anhand des MLD-Maus-Modells wurde bereits nachgewiesen, dass Sulfatid-akkumulierende Neuronen im Spiral-Ganglion des Innenohres, dem Cochlear Nucleus und ventral Cochlear Nucleus im Bereich des auditorischen Signalweges degenerieren (D´Hooge et al., 1999; Wittke et al., 2004). Weiterhin wurden Abweichungen bei der cortikalen Elektroenzephalografie (EEG) nachgewiesen, die sich in einer abnormalen Zunahme der Spannungsamplitude bei ASA-defizienten-Mäusen äußerte, obwohl bei den ASA-defizienten Tieren noch keine epileptischen oder audiogenen Anfälle beobachtet werden konnten (Eckhardt, 2007). Es ist jedoch durchaus denkbar, dass die Entstehung audiogener Anfälle durch eine gesteigerte Sulfatid-Synthese und Akkumulation in den Neuronen intensiviert wird.
Aufgrund dessen wurde der Frage nachgegangen, welche physiologischen Auswirkungen eine Neuronen-spezifische Anreicherung von Sulfatid hervorrufen würde. Zu diesem Zweck wurden transgene Mäuse erzeugt, welche die Cerebrosid-Galaktosyltransferase (CGT) unter dem neuronalen Promotor Thy-1.2 überexprimieren. Die Aktivität des Enzyms CGT führt zur

Bildung von Galaktosyl-Cerebrosid, das durch das Enzym Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) zu Sulfatid umgewandelt wird.

Es konnte festgestellt werden, dass, abhängig von ihrem genetischen Hintergrund (C57BL/6 und C57BL/6/129Ola), diese transgenen CGT-Mäuse eine signifikant verkürzte Lebensspanne aufwiesen und zum Teil sehr plötzlich starben. Außerdem wurde eine erhöhte Rate an audiogenen Anfällen verzeichnet, die teilweise letale Auswirkungen hatten. Audiogene Anfälle können in verschiedenen Mausstämmen induziert werden. In der Literatur werden audiogene Anfälle klassifiziert in wildes Hin- und Herlaufen sowie klonische und tonische Anfälle (Henry, 1967; Schreiber & Graham, 1976). Das wilde Hin- und Herlaufen ist eine Art Ausbruch von unkontrolliertem Rennen und tritt als erstes Sympton auf, gefolgt vom Umfallen der Maus und starkem Zittern (klonisch) und anschließendem Ausstrecken der Zunge (tonisch). Normalerweise werden Mausstämme, die keine Anfälle bekommen, also zunächst resistent gegen akustische Reize sind, durch intensive akustische Schallbelastung während der postnatalen neuronalen Entwicklung sensibilisiert gegenüber akustischen Signalen. Dieser Vorgang wird auch als akustisches „priming“ beschrieben (Henry, 1967; Pierson & Liebmann, 1992; Ross et al., 2001). Im Gegensatz dazu ist bei den transgenen CGT-Mäusen, welche die CGT nur in den Neuronen überexprimieren, ein akustisches „priming“ zur Auslösung audiogener Anfälle nicht notwendig. Denn die transgenen CGT-Mäuse sind von Geburt an sehr geräuschempfindlich und weisen letale audiogene Anfälle bereits nach einer schwachen akustischen Stimulation (z. B. Schlüsselklirren) auf. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Auslöser hierfür die Überexpression des Transgens CGT in den Neuronen und die damit verbundene Sulfatid-Anreicherung ist. Eine Entwicklungsstörung der Neuronen, wie beim akustischen „priming“ ist unwahrscheinlich, da der Thy-1.2 Promotor erst in reifen Neuronen aktiv wird (Caroni, 1997) und die Morphologie des Gehirns der transgenen CGT-Tiere normal ist.

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung konnte die CGT-Expression im Vorderhirn, im Stammhirn und im Rückenmark nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in den Gehirn-Bereichen des Hippocampus, des Cortex und im Colliculus inferior (CI) das mCGT-Transkript detektiert werden. Vor allem in der Gehirnregion des CI war ein intensives *in situ*-Hybridisierungs-Signal erkennbar, das auch mit einer erhöhten c-Fos-Expression einherging. C-Fos gehört zur Familie der *immediate-early-genes* Transkriptionsfaktoren und ist bei neuronaler Aktivität hochreguliert (Morgan et al., 1987; Morgan & Curran, 1989; Kovacs, 2008). Um die auffällig erhöhte neuronale Aktivität nachzuweisen, die die transgenen CGT-Mäuse zeigten, wurde eine histochemische Färbung mit einem c-Fos-spezifischen Antikörper

durchgeführt. Eine erhöhte c-Fos-Expression im Bereich des CI ist von besonderem Interesse, denn der Colliculus inferior zählt zu den auditorischen Strukturen des Gehirns. In der Literatur finden sich bereits Hinweise darauf, dass der CI ein Schlüsselpunkt für die Initiation von audiogenen Anfällen ist und möglicherweise auch audiogene Anfälle aller Art von dort ausgehen können (Clough et al., 1997; Kwon & Pierson, 1997; Morgan & Curran, 1991; Faingold & Casebeer, 1999; Garcia-Cairasco 2002; Kai & Niki, 2002). Ohne akustische Reize wurde bei den transgenen CGT-Mäusen eine 2-fache Erhöhung der c-Fos-Expression in Neuronen festgestellt. Allerdings erhöhte sich nach einem akustischen Reiz (Schlüsselklirren) die Anzahl der c-Fos-positiven-Neuronen um das 6-fache bei den transgenen CGT-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dies zeigt deutlich, dass bei den transgenen Tieren eine stark erhöhte neuronale Aktivität vorhanden ist, die sich in audiogenen Anfällen äußert. Möglicherweise wird dies durch die gesteigerte Expression der CGT und die damit verbundenen erhöhte GalCer und/oder Sulfatid-Menge verursacht.

Eine Rolle bei diesen Anfällen könnte zum einen das GABAerge (γ-Aminobuttersäure) oder das glutamaterge neuronale System spielen. Es wurde beispielsweise bereits festgestellt, dass die Hemmung der GABAergen Neuronen im Colliculus inferior eine entscheidende Funktion bei der Induktion audiogener Anfälle einnimmt (Faingold et al., 2000 und 2002). GABA nimmt unter den inhibitorischen Neurotransmittern des zentralen Nervensystems eine wichtige Aufgabe bei der Kontrolle neuronaler Schaltkreise ein. Es entfaltet seine inhibitorische Wirkung durch Hyperpolarisation der Membran nachgeschalteter Neuronen (postsynaptsiche Inhibition). Störungen der GABAergen Transmission spielen eine wesentliche Rolle bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen.

Kommt es zu einer Reduzierung der GABAergen Neurotransmission führt dies beispielsweise bei GEPR-Ratten (*genetically epilepsy-prone rats)* zu audiogenen Anfällen (Faingold et al., 1989 und 1994). Die GABA-vermittelte Inhibition ist ein wichtiger Bestandteil des akustischen Antwort-Musters der Colliculus inferior-Neuronen. Allerdings spielt die exzitatorische Neurotransmission vermittelt durch den Neurotransmitter Glutamat ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Reaktion der Colliculus inferior-Neuronen auf einen akustischen Reiz. Verschiedene neurochemische wie auch histologische Untersuchungen belegen, dass Glutamat eine signifikante Rolle bei der exzitatorischen Weiterleitung im Colliculus inferior einnimmt (Caicedo & Eybalin, 1999; Feliciano & Potashner, 1995; Liao et al., 2000; Suneja et al., 1995). Kommt es nun zu Veränderungen des Neurotransmitters Glutamat, resultiert dies möglicherweise in einem stark erhöhten neuronalen Feuern der Colliculus inferior-Neuronen, wodurch wiederum die Anfälle als Reaktion auf einen

intensiven akustischen Reiz ausgelöst werden (Faingold et al., 1991a, b und 2000; Li et al., 1999; Zhang & Kelly, 2001).
Wie kommt es nun zu den neuronalen Störungen, die sich evtl. auf die durch GABA bzw. Glutamat induzierte neuronale Hyperpolarisation bei den transgenen CGT-Tieren auswirkt? Die Untersuchungen der (neuronalen) Plasmamembran zeigten spezifisch einen signifikant erhöhten Wert an C18:0-kettigem Sulfatid bei den transgenen CGT-Mäusen. Ebenfalls war bei den Doppel-transgenen Mäusen CST/CGT der Gehalt an Sulfatid im Vergleich zu den Wildtyp- und den einfach transgenen-Mäusen signifikant erhöht.
Da spezifisch der Gehalt an C18:0-Sulfatid in den Neuronen als stark erhöht nachgewiesen wurde, wird ls mögliche Folge der C18:0-Sulfatid-Akkumulation ein Effekt auf die spannungsabhängigen Ionen-Kanäle postuliert. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Sulfatid in Plasmamembranen lokalisiert (Vos et al., 1994; Bansal et al., 1999) und in den so genannten Detergenzien-unlöslichen Mikrodomänen („Lipid-Rafts“) angereichert ist (Blomqvist et al., 2003). Während Intergral-Membranproteine in das Lipid-Milieu der Plasmamembran fest verankert sind, werden die Ionen-Kanäle durch dynamische Veränderungen im Mikromilieu der Membran moduliert (Barrates, 2002; Tilman & Cascio, 2003). Insofern ist es denkbar, dass eine Störung des Membran-Milieus aufgrund von Sulfatid-Anreicherung in der neuronalen Plasmamembran einen Effekt auf die Funktion, die Regulation und den Transport einiger Membran-Proteine (z. B. Ionen-Kanäle und/oder Lipidtransporter) hat. Für die Sphingomyelinase D wurde bereits gezeigt, dass es durch die Freisetzung von negativ geladenen Ceramid-1-Phosphat des Sphingomyelins zur Aktivierung der K^+-Kanäle kommt (Ramu et al., 2006). In Glia-Zellen von ASA-defiezenten Mäusen wurde bereits nachgewiesen, dass MAL (Myelin und Lymphozyten Protein) Sulfatid bindet und folglich in den lysosomalen Kompartimenten fehl-lolkalisiert wird (Saravanan et al., 2004). Nachfolgende Studien zeigten, dass Sulfatid die Aktivität der Na^+/K^+-ATPase sowie verschiedener Kalium-Kanäle beeinflusst (Lingwood et al., 2004 und 2005; Ramu et al., 2006). Auch konnte eine Beeinflussung der Insulin-Sekretion in Pankreas-Zellen durch die Modulation der Aktivität des ATP-sensitiven-K^+-Kanals (K_{ATP}) nachgewiesen werden (Buschard et al., 2002 und 2006). Hierbei inhibiert Sulfatid die Insulin-Sekretion indem es die K^+-Kanal-Sensitivität gegenüber der ATP-Inhibition reduziert. Sulfatid interagiert möglicherweise mit Kir6.2, der porenbildenden Untereinheit des K_{ATP}-Kanals. Dies ist bereits für die langkettigen Lipide CoAs (Coenzym-A Ester) und PIPs (Phosphatidylinositol-Phosphat), die eine Interaktion mit Kir6.2 eingehen, gezeigt (Schulze et al., 2003). Kir6.2 Kanäle werden in vielen Hirnregionen (inklusive des Colliculus inferior) exprimiert (Dunn-

Meynell et al., 1998). Durch die Bindung von ATP an den K_{ATP}-Kanal-Komplex erfolgt eine Schließung des Kanals, was zur Anreicherung von intrazellulärem Kalium führt und eine Membran-Depolarisation bewirkt. Die Depolarisation durch K_{ATP} erhöht wiederum die Erregbarkeit von Neuronen.

So könnte es im Falle der transgenen CGT-Mäuse durch den erhöhten Anteil an Sulfatid zu einer Beeinflussung der K_{ATP}-Kanäle kommen, indem die ATP-Bindung an den Kanal reduziert wird, der Kanal hauptsächlich geöffnet bleibt und es somit durch den dauerhaften Einfluss an Kalium zu einer Membran-Hyperpolarisation kommt. Eine Hyperpolarisation würde die Erregbarkeit von Neuronen herabsetzen. Handelt es sich bei den betroffenen Neuronen um GABAerge Neuronen könnte somit deren inhibitorische Wirkung vermindert und ein audiogener Anfall ausgelöst werden.

Ein weiteres Beispiel für einen durch Sulfatid beeinflussbaren Kanal, der in Neuronen lokalisiert ist, stellt der Calzium-aktivierte Kalium-Kanal (BK_{Ca}-Kanal) dar. Er besitzt eine große Einzelkanalleitfähigkeit und schützt sozusagen als Notbremse die Neuronen vor einem zu starken Anstieg der zellulären Calziumkonzentration. Für seine Aktivierung sind jedoch gewisse Konzentrationen an Calziumionen notwendig. Über eine bimolekulare Kopplung ist eine Interaktion zwischen dem Calzium- und Kalium-Kanal vorhanden, wodurch die K_{Ca}-Kanäle durch hohe Calziumionen-Konzentrationen aktiviert werden. Damit geht auch eine schnelle Änderung des Membranpotentials der Nervenzellen einher (Berkerfeld et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Sulfatid eine wichtige Komponente bei der Öffnung von BK_{CA}-Kanälen ist, indem es die Öffnungsdauer von Calzium- und spannungsabhängigen Kalium-Ionenkanälen steigert (Chi & Qi, 2006). Da die BK_{CA}-Kanäle an vielen pathologischen Prozessen beteiligt sind, könnte eine Veränderung der Sulfatid-Menge in der Plasmamembran wie im Falle der transgenen CGT-Mäuse zu einer neuronalen Dysfunktion führen, die audiogene Anfälle auslösen könnte.

In Bezug auf die audiogenen Anfälle konnte festgestellt werden, dass zwar transgene CGT-Mäuse zu audiogenen Anfällen neigen, im Gegensatz dazu sind jedoch transgene CST-Mäuse nicht von solchen Anfällen betroffen. Es sei jedoch erneut daran erinnert, dass bei den transgenen CST-Mäusen kein erhöhter Sulfatid-Gehalt festgestellt werden konnte. Allerdings zeigen die Mäuse, die sowohl CST als auch CGT überexprimieren (Doppel-transgene Mäuse), eine erhöhte Sensitivität gegenüber audiogener Stimulation. Dies korreliert mit dem erhöhten Sulfatid-Gehalt in den Neuronen bei den Doppel-transgenen- gegenüber den CGT-transgenen-Mäusen. Zwar konnte ein Anstieg an C18:0-kettigem GalCer festgestellt werden, der etwa gleich bei den transgenen CGT- wie auch bei den bei den Doppel-transgenen-Mäusen war,

jedoch wurde bei den transgenen CGT/CST-Mäusen in der neuronalen Plasmamembran ein wesentlich höherer Anstieg an C18:0-kettigem Sulfatid im Vergleich zu den transgenen CGT-Mäusen verzeichnet. Dies deutet darauf hin, dass nicht GalCer sondern Sulfatid für die Anfälle verantwortlich ist.

Auffällig ist jedoch, dass die transgenen Tiere mit zunehmendem Alter keine audiogenen Anfälle mehr bekommen. Auch reagieren sie nur schwach bis gar nicht auf Geräusche in ihrer Nähe. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Mäuse mit fortschreitendem Alter eine Degeneration im Bereich des spiralen Ganglions erlitten haben und taub geworden sind. Bei den ASA-defizienten Mäusen liegt ein ähnlicher Fall vor. ASA-Knockout-Mäuse, die eine beträchtliche Menge an Sulfatid in den Neuronen akkumulieren (Wittke et al., 2004, siehe Ergebnisse 3.1), weisen keine audiogenen Anfälle auf (Dr. M. Eckhardt, persönliche Mitteilung). Ein möglicher Grund hierfür ist der frühe Hörverlust, der auf die relativ frühe Degeneration der spiralen Ganglion-Zellen des Innenohres und der Neuronen des auditorischen Signalsystems bei ASA-defizienten Mäusen zurückzuführen ist (Coenen et al., 2001; D´Hooge et al., 1999). Der Verlust des Gehörs ist bei vielen Nagetieren zu finden, die anfällig sind für audiogene Anfälle, wie zum Beispiel die DBA/2-Mäuse (Willott & Turner, 2000). Ebenfalls konnte bei zwei Epilepsie-Ratten-Stämmen der GEPR-3s und GEPR-9s eine erhöhte Gehör-Reizschwelle nachgewiesen werden (Faingold et al., 1986a, b und 1990). Allerdings zeigte Faingold (2002) auch, dass bei audiogenen Anfall-Formen der frühe Gehörverlust mit einer Änderung der Neurotransmitter im Colliculus inferior einhergeht. Dies könnte als eine Art kompensatorischer Mechanismus als Ausgleich für einen verringerten akustischen Eingang wirken.

Ähnliche Befunde wie die audiogenen Anfälle wurden in Mäusen beschrieben, die Veränderungen in den Gangliosiden aufweisen. Ganglioside sind Glykosphingolipide, die in großer Menge im zentralen Nervensytem vorhanden sind. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und der Funktion des zentralen Nervensystems. So sind Ganglioside wichtig für die Stabilisation der paranodalen Verbindungen. Gangliosid-defiziente-Mäuse entwickeln mit fortschreitendem Alter Störungen in der paranodalen Region (Yamashita et al., 2005). Doppel-Knockout-Mäuse, denen die Gangliosid-GD3-Synthase und die GalNAcT (ß 1,4-N-Acetyl-Galactose-Aminyltransferase) fehlen, synthetisieren GM3 als Hauptgangliosid. Der GM3-Gehalt ist bei diesen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen stark erhöht. GD3/GalNAcT-Knockout-Mäuse zeigen ein ähnliches Verhalten wie die transgenen CGT-Mäuse, in dem Sinn, dass sie sehr anfällig gegenüber akustischen Reizen sind, die letztlich zu letalen audiogenen Anfällen führen (Kawai et al., 2001). Eine Analyse

der Ganglioside von transgenen CGT-Mäusen ergab jedoch keinen signifikanten Anstieg an GM3 oder anderen Gangliosiden. Ferner wurde auch keine Veränderung der Lipidzusammensetzung bei den GD3/GalNAcT-Knockout-Mäusen beschrieben. Daraus ist zu schließen, dass der gesteigerte Sulfatid-Gehalt in den Neuronen keinen entscheidenden Einfluss auf die Biosynthese der Ganglioside hat. Es bleibt dennoch eine interessante und bislang ungeklärte Möglichkeit, den neuronalen GalCer- und Sulfatid-Gehalt bei den GD3/GalNAcT-Knockout-Mäusen auf Gemeinsamkeiten mit den transgenen Thy-1-CGT-Mäusen zu untersuchen. Möglicherweise liegt ein erhöhter GalCer- oder Sulfatid-Gehalt vor, da die fehlenden Ganglioside möglicherweise durch Glykosphingolipide kompensiert werden.
Obwohl die Akkumulation von Sulfatid im Wesentlichen in den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten vorkommt, ist der Gehalt von Sulfatid bei den ASA-defizienten-Mäusen im aufgereinigten Myelin gesteigert. Das weist darauf hin, dass ebenfalls in der Plasmamembran (zumindest von Oligodendrozyten) ein gesteigerter Sulfatid-Gehalt vorhanden ist (Saravanan et al., 2004; Ramakrishnan et al., 2007). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass nicht nur in den transgenen Thy-1-CGT Mäusen, sondern auch in den ASA-defizienten Mäusen der Sulfatid-Gehalt in der Plasmamembran erhöht ist und somit einen Effekt auf die neuronale Erregbarkeit ausübt. Möglicherweise ist dies auch bei MLD-Patienten der Fall.
Die Thy-1-CGT-Mäuse dienen als ein nützliches Modell, um die Auswirkungen eines erhöhten Sulfatid-Gehalts auf die funktionellen Eigenschaften der Neuronen bei MLD-Patienten zu untersuchen. Des Weiteren kann mit Hilfe der transgenen Mäuse die physiologische Rolle von Sulfatid in den Neuronen aufgeklärt werden. Dies ist natürlich nicht nur für die MLD von besonderer Bedeutung, sondern trägt dazu bei, die Rolle, die Sulfatid bei anderen Krankheiten einnimmt, zu bestimmen. So wurde zum Beispiel beschrieben, dass eine reduzierte Menge an Sulfatid in der grauen Substanz bei der Alzheimer-Krankheit festgestellt wurde, was im Hinblick auf einen ApoE-abhängigen Sulfatid-Transport (Han et al., 2007) eine mögliche Erklärung für die Veränderung an Sulfatid in den kortikalen Neuronen wäre.

4.3 Subzelluläre Lokalisations-Analyse der Cerebrosid-Sulfotransferase (CST): Retention der CST im Endoplasmatischen Retikulum

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Ansätze untersucht, die eine Behandlung der lysosomalen Speicherkrankheit MLD ermöglichen. Mögliche Therapieformen beinhalteten die Enzym-Ersatz-Therapie, die Gen-Therapie und die Substrat-Reduktions-Therapie.

Die Enzym-Ersatz-Therapie wurde bereits bei vielen verschiedenen lysosomalen Speicherkrankheiten, wie der Gaucher-Krankheit, Fabry-Krankheit, Pompe-Krankheit und vor allem bei der Mukopolysaccharidose angewendet (Schiffmann & Brady, 2002; Siatskas & Medin, 2001; Hodges & Chen, 2006; Miebach, 2005; Pastores & Thadhani, 2002).

Eine Anzahl von Berichten behandelt Gen-Therapie-Ansätze an Maus-Modellen der lysosomalen Krankheiten (Sands & Davidson, 2006; Matzner & Gieselmann, 2005; Biffi & Naldini, 2005; Eto et al., 2004; Ellinwood et al., 2004). Obwohl einige dieser Studien gute Resultate vorweisen, wird eine klinische Applikation in absehbarer Zukunft noch nicht möglich sein. Im Gegensatz dazu scheint die Substrat-Reduktions-Therapie ein aussichtsreicheres Konzept zu sein, denn diese Therapie-Form ist bereits erfolgreich an Patienten mit der Gaucher-Typ1-Krankheit getestet worden (Jmoudiak & Futerman, 2005; Cox, 2005; Butter et al., 2005; Moyses, 2003). Im Vergleich zu der Enzym-Ersatz-Therapie, besitzt die Substrat-Reduktions-Therapie bei Krankheiten, die das zentrale Nervensystem betreffen, einige Vorteile. Denn anders als bei der Enzym-Ersatz-Therapie, bei der z. T. relativ hochmolekulare Enzyme die Blut-Hirn-Schranke (BHS) passieren müssen, liegt der Vorteil der Substrat-Reduktions-Therapie darin, dass lediglich kleine molekulare kompetitive Inhibitoren die BHS überqueren müssen, um an ihre Zielenzyme binden zu können. So wurde bereits gezeigt, dass das Präparat N-Butyldeoxynojirimycin die Synthese von Glukosylceramid inhibiert und für die Therapie der Gaucher-Krankheit, bei der Glukosylceramid akkumuliert, erfolgreich eingesetzt werden kann (Platt et al., 1994).

Bei der metachromatischen Leukodystrophie ist Sulfatid das akkumulierende Lipid. Die Patienten leiden an einer Demyelinisierung und verheerenden neurologischen Symptomen (von Figura et al., 2001). Da die Synthese von Sulfatid ausgehend vom Ceramid über zwei Schritte erfolgt, die von den Enzymen CGT und CST katalysiert werden, sind diese Enzyme mögliche Ziele für Inhibitoren. Im Gegensatz zu der Glukosylceramidtransferase sind Inhibitoren für die CST oder CGT zurzeit noch nicht verfügbar. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass Mäuse, die nur eine funktionale Kopie des CGT-Gens tragen, eine reduzierte Menge an Galaktosylceramid sowie auch an Sulfatid aufweisen (Bosio et al., 1996; Coetzee et al.,

1996). Dies verdeutlicht, dass die Inhibition der CGT sowie der CST eine mögliche Option ist, die Sulfatidakkumulation bei der MLD zu reduzieren.

Sowohl der Test von potentiellen Inhibitoren als auch das rationale Design von Inhibitoren bedarf der genauen Kenntnis der enzymatischen und strukturellen Eigenschaften des Sulfatid-synthetisierenden Enzyms, der CST. Daher werden große Mengen an gereinigtem Enzym benötigt, die für die Identifikation von Inhibitoren und für strukturelle Untersuchungen verwendet werden könnten.

Die CST ist ein TypII-Transmembran-Protein, das eine Sulfatgruppe auf die 3-Hydroxyl-Gruppe des Galaktosylcerebrosids überträgt. Voruntersuchungen zeigten bereits, dass lösliche CST (ohne Transmembran-Domäne) nicht aus der Zelle transportiert wird, sondern zum größten Teil in der Zelle verbleibt (Mitteilung von Mandy Karbach). Die Untersuchung modifizierter Deletions-Konstrukte, wie z. B. die 39CST (ohne Transmembran-Domäne), oder von Fusions-Proteinen der CST mit sekretorischen Proteinen (z. B. AchE-Furin-lCST) zeigten zwar, dass ein Teil der synthetisierten CST im Zellüberstand zu finden war, jedoch weiterhin der größte Anteil in der Zelle verblieb. Dies konnte auch durch Co-Lokalisationsstudien mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen bestätigt werden. Mit einem Antikörper gegen ein ER-spezifisches Protein und dem Fusions-Protein $CST_{1\text{-}36}$-GFP (36 Aminosäurereste der amino-terminalen Domäne) als spezifischer Golgi-Marker, wurde eine zelluläre Lokalisation des Proteins CST durchgeführt. Der überwiegende synthetisierte Anteil der untersuchten CST befand sich im ER.

Möglicherweise ist durch das Entfernen der Transmembran-Domäne ein noch nicht bekanntes ER-Lokalisationssignal freigelegt worden. Im Falle des NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor wurde gezeigt, dass zu den bereits bekannten ER-Rückhaltesignalen noch ein weiteres ER-Rückaltesignal vorhanden ist (Qui et al., 2009). Der NMDA-Rezeptor ist ein heteromerer Komplex. Die Haupt-*splice*-Variante NR1- und die Untereinheit-NR2 werden im ER zurückgehalten, wenn sie alleine exprimiert werden. Werden sie jedoch zusammen exprimiert, wird ein funktionsfähiger Rezeptor an der Zell-Oberfläche geformt (McIlhinney et al., 1998; Okabe et al., 1999; Fukaya et al., 2003). Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass die NR1-Untereinheit zwei ER-Retentions Motive, RRR und KKK, besitzt (Standley et al., 2000; Horak & Wenthold, 2009). Im Falle der NR2A-Unterheit stellte sich heraus, dass ein weiteres ER-Rückhaltesignal in dieser Untereinheit vorhanden ist und dass dies durch die Komplexbildung mit NR1 maskiert wird (Qui et al., 2009). In gleicher Weise könnten im Falle der CST mehrere restriktive Mechanismen für die Qualitätskontrolle der CST im ER vorhanden sein.

Es wird vermutet, dass die ER-Retention der CST durch ihre luminale katalytische Domäne vermittelt wird. Gestützt wird diese Theorie durch Untersuchungen an Fusionsproteinen, wobei ein GFP-Fusions-Protein mit der amino-terminalen Domäne der CST effizient zum Golgi-Apparat transportiert wird (Yaghootfam et al., 2007), wohingegen ein Fusions-Protein, das die katalytische Domäne der CST besitzt und fusioniert ist mit der amino-terminalen Membran-Domäne eines Plasmamembran-Proteins (Dipeptidylpeptidase IV), im ER zurückgehalten wird. Letzteres spricht dafür, dass ein „verstecktes" ER-Rückhaltesignal vorhanden ist, das den Weitertransport zum Golgi verhindert, sobald die CST so modifiziert ist, dass der entsprechende verbergende Enzymbereich nicht exprimiert wird.
Eine andere Möglichkeit wäre, dass ein noch unbekannter Export-Faktor den ER-Export der CST limitiert. Es ist beispielsweise denkbar, dass MAL (Myelin und Lymphozyten Protein) und PLP (Proteolipid Protein) für den Transport der CST notwendig sind. Die Eliminiation von endogenem MAL führt zur Blockierung des apikalen Transports von Membran- und sekretorischen Proteinen (Cheong et al., 1999; Puertollano & Alonso, 1999a; Puertollano et al., 1999b; Martin-Belmonte et al., 2000 und 2001). PLP ist ein Integral-Transmembran-Protein, das durch Protein-Lipid Interaktion an der Sortierung und dem direkten Membran-Transport von Myelin-Komponenten beteiligt ist (Krämer et al., 2001). Ein Defekt des PLP führt zur Demyelinisierung und axonaler Degeneration in PLP-Knockout-Mäusen (Griffiths et al., 1998a, b).
In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings sowohl mit MAL als auch mit PLP bei einer Co-Transfektion mit 39CST keine Co-Lokalisation oder eine subzelluläre Veränderung der 39CST beobachtet werden, so dass MAL und PLP als mögliche Transporter-Proteine der CST ausgeschlossen werden. Der Frage, ob andere Transporter-Proteine für den Weitertransport von Relevanz sind, sollte weiterhin nachgegangen werden. Es ist jedoch ebenfalls nicht auszuschließen, dass der betreffende Transport-Faktor in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (CHO-K1, COS) nicht vorhanden ist, so dass es ausschließlich durch den fehlenden Transporter der CST zu einer Anreicherung von CST im ER kommt. Diese Frage könnte weiterhin durch Verwendung geeigneter Zellkulturen und/oder Primärzellen geklärt werden.
Die Akkumulation von CST im ER könnte auch mit Hilfe der „Kin recognition"-(Verwandtschafts-Erkennungs-) Hypothese erklärt werden. Die „Kin recognition"-Hypothese basiert auf der Interaktion von Enzymen mit ihren Nachbarenzymen mittels ihrer Transmembran-Domäne. Die durch diese Interaktion entstehenden Oligomere sind zu groß, um in Vesikel verpackt zu werden und um das ER oder den Golgi-Apparat auf sekretorischem Wege zu verlassen (Nilsson et al., 1991 und 1993). Untersuchungen an den Golgi-Enzymen

N-Acetyl-Glucoaminyltransferase I (NAGT I) und Mannosidase II (Mann II) zeigen zum Beispiel, dass NAGT I und Mann II spezifisch über ihre Transmembran-Domäne interagieren, so dass es zu einer Akkumulation der Proteine im Golgi kommt (Nilsson et al., 1994). Die „Kin-recognition“-Oligomerisation für Hetero- wie auch Homo-Oligomere ist demnach ein einfacher effektiver Weg, Proteine entlang des sekretorischen Signalweges zurückzuhalten. Die CST könnte ebenso eine Oligomerisation mit einem anderen verwandten Enzym oder mit sich selbst über die Membran-übergreifende-Domäne eingehen. Fehlt jedoch dieser Oligomerisations-Partner, könnte dies einen Rücktransport zum ER bewirken. Die Expressionen von p33 und NAGT I, das normalerweise mit Mann II interagiert, bewirkte so zum Beispiel eine Relokalisation von endogenem Mann II ins ER, da die Interaktion mit NAGT I durch p33 blockiert war (Nilsson et al., 1994). Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse, die mit dem DPPIV-TM-39CST-Konstrukt durchgeführt worden sind. Hierbei wurde die Transmembran-Domäne der CST mit der Transmembran-Domäne der Dipeptidylpeptidase IV ausgetauscht. Dies führte auch nicht zu einem ER-Export.

Durch die starke Überexpression der CST aufgrund der transienten Transfektion, ist eine ER-Retention wegen einer Fehlfaltung des Enzyms ebenfalls möglich. Unter physiologischen Umständen wird jedes neu synthetisierte Protein nach der Insertion in die ER-Membran durch luminale Chaperone, wie Calnexin, Calreticulin oder Protein Disulfid-Isomerase gebunden, deren Aufgabe es ist, die Proteinfaltung, die für die Protein-Reifung und Oligomerisierung notwendig ist, zu ermöglichen (Helenius et al., 1992). Fehlgefaltete Proteine werden am Weitertransport gehindert und abgebaut, womit dem ER eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle des Protein-Transportes innerhalb des sekretorischen Weges zu kommt (Hammond & Helenius, 1995). Die Überexpression der CST könnte eine erhöhte Rate an fehlgefalteten CST-Proteinen bewirken, wodurch eine komplexe Interaktion der missgefalteten CST mit Chaperonen hervorgerufen wird. Diesem Komplex ist es nicht mehr möglich das ER zu verlassen. Untersuchungen am G-Protein des Vesikulären Stromatitis Virus (VSV) zeigten, dass es zu Komplexen von fehlerhaft-gefalteten VSVG-Proteinen kommt, die unter anderem den Komplex VSVG-Calnexin einschließen, und daher eine Beeinflussung der Mobilität von VSVG besteht, so dass es im ER verbleibt (de Silvia et al., 1993; Nehls et al., 2000). Interaktionen zwischen fehlgefalteten Proteinen und ER-Chaperonen können irreversibel werden, möglicherweise durch eine Veränderung der ER-Matrix. Obwohl im ER von lebenden Zellen die Chaperone dazu beitragen, Aggregation und nicht-produktive Interaktionen von gefalteten Proteinen zu verhindern, werden solche Reaktionen nicht immer vollkommen unterdrückt. Ob ein Protein eine Aggregation oder

Fehlfaltung durchmacht oder nicht, und ob die Aggregate permanent oder nur transient sind, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Diese Faktoren können sowohl die Struktur der Proteine, die Konzentration und die Expressions-Stärke des Proteins, sowie die Faltungsrate und die Konzentration von möglichen Faltungs-Helfer-Enzymen beeinflussen oder Chaperone sein. Im Falle des CST-Proteins könnte dieser Chaperon-CST-Komplex verhindern, dass irreversible intermolekulare Interaktionen innerhalb der Zelle entstehen. Ob und wie die CST ebenfalls einen Chaperon-Komplex eingeht (ähnlich wie das VSVG-Protein), könnte durch weitere Untersuchung beispielsweise mit Hilfe der Photobleaching-Technik und / oder Zeitraffer-Aufnahmen geklärt werden.

Des Weiteren ist von vielen Proteinen bekannt, dass diese zwischen dem ER und dem Golgi hin und her transportiert werden. Sie besitzen ein dibasisches Signal in ihrer zytoplasmatischen Domäne, das anscheinend von einem Sortierungs-Mechanismus erkannt wird, der anschließend den Rücktransport vom Golgi vermittelt (Letourneur et al., 1994). Einen Nachweis für die Existenz von Golgi-Enzymen, die konstitutiv zwischen dem Golgi und ER pendeln, erbrachten Untersuchungen an Zellen, welche die Mutante Sar1 exprimieren, wodurch der ER-Export blockiert ist (Storrie et al., 1998; Zaal et al., 1999). Diese Studien zeigten, dass die Mehrheit der Golgi-Enzyme innerhalb eines Zeitblockes im ER festgehalten und viele Enzyme zum ER zurück transportiert und somit recycelt werden. Dieser Zeitblock dauerte ungefähr drei bis fünf Stunden und entsprach der Mitosephase des Zellzyklus (Zaal et al., 1999). In welcher Zellzyklus-Phase sich die CST-transfizierten Zellen zum Zeitpunkt der Untersuchung befanden, wurde nicht erfasst, so dass eine Aussage zum ER-rückwärtsgerichteten Transport schwierig ist. Für das Vorliegen eines Rücktransports vom Golgi zum ER spricht zwar, dass bei den Immunfluoreszenz-Untersuchungen teilweise eine Golgi-Färbung zu beobachten war. Allerdings befand sich bei allen verschiedenen untersuchten CST-Konstrukten der überwiegende Teil des synthetisierten CST-Proteins im ER. Interessanterweise zeigten die humanen Sulfotransferasen (Gal3ST1, Gal3ST2 und Gal3St4) eine verstärktes Vorkommen im ER.

In der Konsequenz ist davon auszugehen, dass der rückwärtsgerichtete Transport zum ER im Falle der CST eher eine untergeordnete Rolle für die ER-Lokalisation der CST ist spielt. Vielmehr ist vermutlich eine oder mehrere der weiter oben genannten Möglichkeiten für die Akkumulation der CST im ER verantwortlich.

4.4 Ausblick

Das Modell des Sulfatid-Transports von Oligodendrozyten zu Neuronen mit Hilfe von Apolipoprotein-E, das aus Astrozyten stammt, konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Zur genauen Charakterisierung der neuronalen Sulfatid-Akkumulation sind weitere mögliche Transport-Wege des Sulfatids bzw. dessen Synthese in den Neuronen zu untersuchen. Da gezeigt worden ist, dass sich in den von Oligodendrozyten sezernierten Exosomen neben den typischen Myelin-Proteinen auch GalCer und Sulfatid befinden (Krämer-Albers et al., 2007), könnten Analysen der neuronalen Plasmamembran darüber Aufschluß geben, ob es überhaupt einen Transport-Weg gibt. Werden Exosomen, die Sulfatid beinhalten, identifiziert, könnte dies die Sulfatid-Anreicherung in den Neuronen erklären. Auch eine genaue Bestimmung der Sulfatidspezies der neuronalen Plasmamembran von ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen durch ESI-MS könnte einige Rückschlüsse auf mögliches exogenes Sulfatid ermöglichen. Eventuelle Unterschiede in der Differenzierung von Neuronen, die Sulfatid akkumulieren, könnten mit Hilfe der Technik der Primärkultur nachgewiesen werden. Dabei wäre eine Aufdeckung von morphologischen Veränderungen denkbar, die *in vivo* möglicherweise nicht erkennbar sind. Eine saubere Neuronen-Kultur von ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen ohne Oligodendrozyten oder andere Gliazellen könnte mit Hilfe von radioaktiver metabolischer Markierung zeigen, ob eine endogene Sulfatidsynthese vorhanden ist. Eine weitere interessante Analyse wäre die Herstellung eines Maus-Modells, dass eine ASA- sowie eine CGT-Defizienz besitzt und die CGT in Oligodendrozyten überexprimiert (ASA (-/-)/CGT (+/-)/tg-PLP-CGT). Sofern in diesen Tieren eine Sulfatid-Akkumulation in den Neuronen zum Beispiel mit Alcianblau-Färbung nachgewiesen werden kann, würde dies daraufhin deuten, dass das Sulfatid von den synthetisierenden Oligodendrozyten stammt und ein weiterer ApoE-unabhängiger Transportweg von Sulfatid zu den Neuronen besteht. Findet man dagegen keine Sulfatid-Speicherung mehr in den Neuronen, würde dies für eine endogene Sulfatid-Synthese in den Neuronen sprechen.

Die audiogenen Anfälle bei den transgenen CGT-Mäusen korrelieren mit der Menge an Sulfatid in den Neuronen. Elektronenzephalogramm (EEG)-Untersuchungen am Colliculus inferior könnten zeigen, ob ein mögliches epileptisches EEG-Muster vorliegt, und somit einen eindeutigen Hinweis auf die neuronale Beeinflussung der Reizweiterleitung geben.

Eine immunhistochemische-Analyse von GABA oder Glutamat sowie ein Aktivitäts-Nachweis der beiden Neurotransmitter würde dazu beitragen, zu erkennen, inwieweit die inhibitorische oder die erregende Reizweiterleitung durch den erhöhten Sulfatid-Gehalt beeinflusst wird. Immunfärbungen der Natrium- und Kaliumkanäle könnten Aufschluss darüber geben, ob diese durch die Anreicherung an Sulfatid in der Plasmamembran Beeinträchtigungen aufweisen. Weiterhin würden Untersuchungen an Lipid Rafts in der Plasmamembran aufzeigen, ob es zu Veränderungen in der Sulfatid-abhängigen Sortierung von Membran-Proteinen kommt.

Mit Analysen der spiralen-Ganglion-Zellen könnte geklärt werden, inwieweit die geringere Sensitivität gegenüber audiogenen Reizen bei den älteren transgenen CGT-Mäuse von einer Degeneration der spiralen Ganglion-Zellen im Innenohr und den Neuronen des Gehörgangs stammt.

Der Weitertransport der exprimierten CST wird behindert durch deren Retention im ER. Ein effizienter Export der CST erfordert eventuell einen ER-Export-Faktor, der z. B. ein Chaperon sein könnte. Zunächst sollte jedoch ausgeschlossen werden, dass die Retention im ER aufgrund einer Fehlfaltung entsteht. Denkbar wäre der Nachweis der spezifischen Aktivität der CST im ER und im Golgi Apparat, die natürlich am intakten Enzym um ein Vielfaches höher wäre, als am fehlgefalteten.

Ein effizienterer Export aus dem ER ist möglicherweise in Zellen vorhanden, die endogene CST exprimieren. Mittels Untersuchungen an Zellen von denen bekannt ist, dass sie CST synthetisieren (wie Schwann-Zellen, Oligodendrozyten, Nieren-Zellen), könnte bestimmt werden, ob in den Zellen, die keine endogene CST exprimieren, der entscheidende Export-Faktor fehlt, und es deshalb zur Akkumulation kommt.

Zusätzlich könnte eine Expressions-Klonierungs-Methode dazu beitragen, ER-Export-Faktoren zu identifizieren. Eine cDNA-Bibliothek aus CST-exprimierenden und Sulfatid-synthetisieren Zellen oder Geweben wird in Zellen exprimiert, welche die CST stabil exprimieren. Zellen, die dann den ER-Export-Faktor exprimieren und somit die CST aus dem ER schleusen, sollten an der Zelloberfläche befindlichen CST hängen bleiben. Diese Zellen könnten dann mittels verschiedener Antikörper untersucht werden, wodurch der gesuchte Faktor ermittelbar wird.

5 Zusammenfassung

Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine genetisch bedingte Defizienz des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A und führt zur lysosomalen Akkumulation von Sulfatid sowie einer schwerwiegenden Demyelinisierung im zentralen Nervensystem des Menschen. Ein Tier-Modell der MLD sind die ASA-Knockout-Mäuse, die durch die Inaktivierung des ASA-Gens erzeugt wurden. Die ASA-Knockout-Mäuse entwickeln lysosomale Sulfatid-Speicherungen ähnlich wie bei der humanen MLD.

Galaktosylceramid (GalCer) und 3-O-Sulfogalactosylceramid (Sulfatid) gehören zu den häufigsten Sphingolipiden in Myelin-produzierenden Glia-Zellen, konnten jedoch beide auch in Neuronen nachgewiesen werden. Ob es sich dabei um endogenes oder aus Glia-Zellen stammendes GalCer und Sulfatid handelt, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Han beschrieb ein Modell, in dem Sulfatid durch Apolipoprotein E von Astrozyten zu Neuronen transportiert wird. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Sulfatid-Akkumulation in den Neuronen von ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen. Unabhängig vom zusätzlichen eingebrachten ApoE-Knockout zeigten die ASA/ApoE-Knockout-Mäuse ebenso wie die ASA-Knockout-Mäuse einen gleichsam erhöhten Sulfatid-Gehalt im Cortex und im gesamten Gehirn im Alter von 18-24 Monaten. Die Sulfatid-Akkumulation wurde durch histochemische Färbungen mit Alcianblau nachgewiesen. Sulfatid-Speicherung wurde bereits bei jüngeren Tieren (12 Monate) und verstärkt bei den älteren Tieren in Neuronen bei den ASA- und ASA/ApoE-Knockout-Mäusen detektiert. Die neuronale Sulfatid-Anreicherung, besonders im Bereich der Medulla oblongata und Pons, deutet darauf hin, dass die ApoE-Defizienz in den Doppel-Knockout-Tieren keinen wesentlichen Einfluss auf die Akkumulation von Sulfatid in Neuronen hat. Daher ist die Anreicherung von Sulfatid entweder von einem anderen Transporterweg abhängig, oder die Akkumulation in den Neuronen entsteht durch endogen synthetisiertes Sulfatid.

Transgene Thy-1-CGT-Mäuse überexprimieren die Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) unter dem neuronalen Promotor Thy-1 und synthetisieren in den Neuronen C18:0-GalCer und Sulfatid in verschiedenen Bereichen des Gehirns. Diese transgenen CGT-Mäuse weisen auf dem C57BL/6

Hintergrund eine signifikant reduzierte Lebensspanne auf. Zusätzlich wurde bei den transgenen CGT-Mäusen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber akustischen Reizen festgestellt. Nach einer relativ milden Geräusch-Stimulation wie Schlüsselklirren (ca. 90-100 dB) entwickelten die transgenen CGT-Tiere letale audiogene Anfälle, die sich in unkontrolliertem Hin- und Herlaufen äußerte, die mit Krämpfen verbunden waren und sogar teilweise zum Tod des transgenen Tieres führten. Allerdings konnten bei den transgenen Mäusen, die die Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) in den Neuronen überexprimieren, keine solchen Anfälle beobachtet werden. In Doppel-Transgenen Tieren, die sowohl CGT wie CST exprimieren, wurde dagegen eine stärkere Sensitivität gegen audiogene Reiz-Induktion im Vergleich zu den transgenen CGT-Mäusen erfasst. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, korreliert diese verstärkte audiogene Sensitivität mit dem erhöhten Sulfatid-Gehalt in der neuronalen Plasmamembran von CST/CGT-transgenen Mäusen im Vergleich zu transgenen CGT-Mäusen. Verursacht durch den erhöhten Sulfatid-Gehalt in den Neuronen kommt es zu den letalen audiogenen Anfällen bei den transgenen Mäusen. Da bei der lysosomalen Speicherkrankheit MLD Sulfatid-Akkumulation in den Neuronen vorhanden ist und MLD-Patienten ähnliche neurologische Symptome aufweisen, können diese Ergebnisse sowie weitere Untersuchungen tiefere Einblicke in die neurologischen Auswirkungen dieser Krankheit anhand des transgenen Maus-Modells liefern.

Eine mögliche therapeutische Option für die lysosomale Speicherkrankheit MLD ist die Substrat-Reduktions-Therapie, wobei die Synthese des akkumulierenden Sulfatids durch spezifische Inhibitoren verhindert werden soll. Im Falle der MLD wird der letzte Schritt der Sulfatid-Synthese, der Transfer einer Sulfatgruppe auf Galaktosylcerebrosid von der CST, einem Typ II–Transmembran-Protein katalysiert. Die Produktion einer großen Menge an CST-Protein sollte es ermöglichen, eine detaillierte Struktur-Analyse sowie die Testung von potentiellen Inhibitoren durchzuführen. Allerdings wird die Expression einer großen Menge des CST-Proteins durch dessen ineffizienten Export aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) erschwert. Untersuchungen mit verschiedenen CST-Fusions-Proteinen ergaben, dass die CST zum größten Teil im ER zurückgehalten wird. Diese ER-Retention könnte möglicherweise durch die luminale katalytische Domäne hervorgerufen werden. Ein Fusions-Protein aus der amino-terminalen Membran-Domäne der CST und einem GFP-Reporter-Protein wurde effizient in den Golgi-Apparat transportiert, im Gegensatz dazu verblieb ein Fusions-Protein, bestehend aus der katalytischen Domäne der CST und der amino-terminalen Transmembran-Domäne eines Plasmamembran-Proteins (Dipeptidylpeptidase IV), im ER.

Interessanterweise zeigten Expressions-Analysen an den humanen Sulfotransferasen Gal3ST1, Gal3ST2 und Gal3ST4, dass bei diesen ebenfalls eine ER-Export-Blockierung vorhanden ist. Da die relative Menge des im ER zurückgehaltenen CST-Proteins mit dem Expressions-Gehalt ansteigt, könnte der Transport der CST aus dem ER durch einen noch unbekannten ER-Export-Faktor limitiert sein.

6 Abstract

An inherited deficiency for lysosomal enzyme Arysulfatase A (ASA) leads to 3-*O*-sulfo-galactosylceramide (sulfatide) accumulation and drastic demyelination in the central nervous system of humans. These cause the inherited lysosomal storage disease “metachromatic leukodystrophy” (MLD). As an animal model, the ASA-knockout mice have previously been generated by disruption of the ASA gene, such that ASA-knockout mice develop lysosomal sulfatid accumulation similar to the human MLD. Galactosylceramide (GalCer) and sulfatide are abundant sphingolipids in myelinating glial cells. Besides this, low levels of GalCer and sulfatide have been found in neurons. To date, it is not well understood, whether neuronal sulfatide is synthetized endogenously or rather, transported to neurons via an as yet unknown mechanism. In a transport model described by Han, sulfatide is transported by apolipoprotein E from astrocytes to neurons. In the present study it should be elucidated, whether the neuronal distribution of sulfatide storage in ASA- and ASA/ApoE-knockout mice differ in any way. We could show, that double-knockout mice as well as the ASA-knockout mice showed an increased sulfatide-level in the cortex and brain of 18-24 month old mice, which is to day that the additional ApoE-knockout did not cause any difference in neuronal sulfatide levels. By means of histochemical staining using alcian-blue it was proven that neuronal sulfatide storage was already detectable in relatively young mice of 12 months and intensified in older ASA- and ASA/ApoE-knockout mice. Neuronal sulfatide was most prominent in many nuclei of the medulla oblongata and pons in both, ASA- and ASA/ApoE-knockout mice, suggesting that the ApoE-deficiency does not have any different effect on the neuronal accumulation of sulfatide in ASA/ApoE-knockout mice as compared to ASA-knockout mice. It can therefore be concluded that sulfatide storage in neurons are either due to a completly different transport-protein or the accumulation is generated by endogenously synthesized sulfatide in neurons.

Transgenic mice overexpressing UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase (CGT) under the control of the Thy1.2 promoter synthesize C18:0 fatty acid containing GalCer and sulfatide in

neurons. Depending on the genetic background, these transgenic mice have a significantly reduced life span; e.g. mice on a C57Bl/6 background died earlier as compared to their counterparts on C57Bl/6/129Ola background. Transgenic mice were extremely sensitive to sound stimuli and displayed lethal audiogenic seizures after relatively mild acoustic stimulation, i.e. key jangling (90-100 dB), which was reflected in a wild running phase followed by muscle spasms and partly occurring death. However, transgenic mice expressing cerebroside-sulfotransferase (CST) in neurons did not show sensitivity to audiogenic seizures. In contrast, transgenic mice expressing CGT and CST were characterized by an enhanced sensitivity to audiogenic seizure induction. The latter correlated with elevated sulfatide levels in neuronal plasmamembranes of double transgenic mice in comparison to CGT-transgenic mice, and strongly suggested that lethal audiogenic seizures are caused by elevated sulfatide levels in transgenic neurons. During the lysosomal storage disease MLD, neurons accumulate substantial amounts of sulfatide as well, which possibly contributes to the pathogenesis of the disease. CGT-transgenic mice can therefore be considered as a useful animal model to further investigate how sulfatide affects functional properties of neurons.

Even if there is no cure of the lysosomale storage disease MLD up until now, there are different approaches tested, of which substrate-reduction therapy currently seems to be the most promissing. Here, the synthesis of accumulating sulfatide is inhibited by specific small inhibitors, which are particularly modified to be able to cross the blood-brain barrier (BBB). In case of MLD, the very last step of sulfatide synthesis is the transfer of a sulphate group to galactosylcerebroside. This reaction is catalyzed by the CST, a type II transmembrane protein. Large amounts of purified CST are needed in order to allow detailed structural analysis and screening for specific inhibitors. However, the inefficient export of the enzyme from the endoplasmtic reticulum (ER) impedes high level purification of CST. Studies on different CST fusion-proteins indicated that high amounts of the CST are retained in the ER, which is most probably mediated by its luminal catalytic domain. In fact, a protein consisting of the amino-terminal membrane domain of CST fused to an EGFP reporter protein was efficiently transported to the Golgi Apparatus, whereas a fusion protein of the catalytic domain of CST with the amino-terminal membrane domain of dipeptidylpeptidase IV was retained in the ER. Interestingly, the expression of human sulfotransferases Gal3ST1, Gal3ST2 and Gal3ST4 demonstrated that their export from the ER was blocked, too. The relative amount of CST retained in the ER increased with the expression level of the protein, suggesting that an unknown ER export factor might limit ER export of the CST.

7 Literatur

- Arvanitis D., Dumas M., Szuchet S. (1992). Myelin palingenesis. 2. Immunocytochemical localization of myelin/oligodendrocyte glycolipids in multilamellar structures. Dev Neurosci 14:328-335.
- Austin J., Balasubramanian A.S., Pattabiraman T.N., Saraswathi S., Basu D.K., Bachhawat B.K. (1963). A Controlled Study Of Enzymic Activities In Three Human Disorders Of Glycolipid Metabolism. J Neurochem 10:805-816.
- Bansal R., Winkler S., Bheddah S. (1999). Negative regulation of oligodendrocyte differentiation by galactosphingolipids. J Neurosci 19:7913–7924.
- Barrantes F.J. (2002). Lipid matters: nicotinic acetylcholine receptor-lipid interactions Mol Membr Biol 19:277-284.
- Basu S., Kaufman B., Roseman S. (1968). Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. J Biol Chem 243:5802-5804.
- Basu S., Schultz A.M., Basu M., Roseman S. (1971). Enzymatic synthesis of galactocerebroside by a galactosyltransferase from embryonic chicken brain. J Biol Chem 246:4272-4279.
- Baumann N. & Pham-Dinh D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev 81:871-927.
- Bechmann I. & Nitsch R. (1997). Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining. Histochem Cell Biol 107:391-397.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2003). Biochemie. Spektrum Berlin.
- Berkefeld H., Sailer C.A., Bildl W., Rohde V., Thumfart J.O., Eble S., Klugbauer N., Reisinger E., Bischofberger J., Oliver D., Knaus H.G., Schulte U., Fakler B. (2006). BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca^{2+}-activated K^{+} signaling. Science 314:615-620.

- Berntson Z., Hansson E., Rönnbäck L., Fredman P. (1998). Intracellular sulfatide expression in a subpopulation of astrocytes in primary cultures. J Neurosci Res 52:559–568.
- Bethke U., Müthing J., Schauder B., Conradt P., Mühlradt P.F. (1986). An improved semi-quantitative enzyme immunostaining procedure for glycosphingolipid antigens on high performance thin layer chromatograms. J Immunol Methods 89:111-116.
- Beutler E. & Grabowski G.A. in: Scriver C.R., Beaudet AL., Vall D., Sly W.S. (1995). The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw Hill, NY 2641-2670.
- Biffi A. & Naldini L. (2005). Gene therapy of storage disorders by retroviral and lentiviral vectors. Hum Gene Ther 16:1133–1142.
- Bligh E.G. & Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 37:911-917.
- Blomqvist M., Osterbye T., Mansson J.E., Horn T., Buschard K., Fredman P. (2003). Selective lack of the C16:0 fatty acid isoform of sulfatide in pancreas of type II diabetic animal models. APMIS 111:867–877.
- Bosio A., Binczek E., Stoffel W. (1996). Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 93:13280-13285.
- Bosio A., Binczek E., Haupt W. F., Stoffel W. (1998). Composition and biophysical properties of myelin lipid define the neurological defects in galactocerebroside- and sulfatide-deficient mice. J Neurochem 70:308-315.
- Brady R.O., Kanfer J.N., Shapiro A.D. (1965). Metabolism of Glucocerebrosides. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. Biochem Biophys Res Commun 18:221-225.
- Brown D.A. & London E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. Annu Rev Cell Dev Biol 14:111-136.
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA E.coli strain with beta-galactosidase selection. Biotechinques 5:376-378
- Bullitt E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J Comp Neurol 296:517-530.
- Buschard K., Høy M., Bokvist K., Olsen H.L., Madsbad S., Fredman P., Gromada J. (2002). Sulfatide controls insulin secretion by modulation of ATP-sensitive K(+)-

channel activity and Ca(2+)-dependent exocytosis in rat pancreatic beta-cells. Diabetes 51:2514-2521.

- Buschard K., Blomqvist M., Månsson J.E., Fredman P., Juhl K., Gromada J. (2006). C16:0 sulfatide inhibits insulin secretion in rat beta-cells by reducing the sensitivity of KATP channels to ATP inhibition. Diabetes 55:2826–2834.
- Butters T.D., Dwek R.A., Platt F.M. (2005). Imino sugar inhibitors for treating the lysosomal glycosphingolipidoses. Glycobiology 15:43–52.
- Caicedo A. & Eybalin M. (1999). Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. Eur J Neurosci 11:51-74.
- Caroni P. (1997). Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. J Neurosci Methods 71:3–9.
- Cheng H., Zhou Y., Holtzman D.M., Han X. (2008). Apolipoprotein E mediates sulfatide depletion in animal models of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, article in press.
- Cheong K.H., Zacchetti D., Schneeberger E.E., Simons K. (1999). VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. Proc Natl Acad Sci USA 96:6241-6248.
- Chi S. & Qi Z. (2006). Regulatory effect of sulphatides on BKCa channels. Br J Pharmacol 149:1031–1038.
- Clough R.W., Eells J.B., Browning R.A., Jobe P.C. (1997). Seizures and proto-oncogene expression of c-fos in the brain of adult genetically epilepsy-prone rats. Exp Neurol 146:341-353.
- Coenen R., Gieselmann V., Lüllmann-Rauch R. (2001). Morphological alterations in the inner ear of the arylsulfatase A-deficient mouse. Acta Neuropathol 101:491-498.
- Coetzee T., Fujita N., Dupree J., Shi R., Blight A., Suzuki K., Suzuki K., Popko B. (1996). Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. Cell 86:209-219.
- Colley K.J. (1997). Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. Glycobiology 7:1-13.
- Cox T.M. (2005). Substrate reduction therapy for lysosomal storage diseases. Acta Paediatr Suppl 94:69–75.
- D'Hooge R., Coenen R., Gieselmann V., Lüllmann-Rauch R., De Deyn P.P. (1999a). Decline in brainstem auditory-evoked potentials coincides with loss of spiral ganglion cells in arylsulfatase A-deficient mice. Brain Res 847:352-356.

- D'Hooge R., Hartmann D., Manil J., Colin F., Gieselmann V., De Deyn P.P. (1999b). Neuromotor alterations and cerebellar deficits in aged arylsulfatase A-deficient transgenic mice. Neurosci Lett 273:93–96.
- D'Hooge R., van Dam D., Franck F., Gieselmann V., De Deyn P.P. (2001). Hyperactivity, neuromotor defects, and impaired learning and memory in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. Brain Res 907:35–43.
- de Silva A., Braakman I., Helenius A. (1993). Posttranslational folding of vesicular stomatitis virus G protein in the ER: involvement of noncovalent and covalent complexes. J Cell Biol 120:647–655.
- Drenkhahn D. & Zenker W. (1994). Benninghoff Anatomie. Urban und Schwarzenberg Wien/München/Baltimore 1:15. Auflage.
- Dunn-Meynell A.A., Rawson N.E., Levin B.E. (1998). Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K+ channel in rat brain. Brain Res 814:41-54.
- Dupree J.L., Coetzee T., Suzuki K., Popko B. (1998). Myelin abnormalities in mice deficient in galactocerebroside and sulfatide. J Neurocytol 27:649-659.
- Eckhardt M., Fewou S.N., Ackermann I., Gieselmann V. (2002). N-glycosylation is required for full enzymic activity of the murine galactosylceramide sulphotransferase. Biochem J 368:317-324.
- Eckhardt M., Khalaj Hedayati K., Pitsch J., Lüllmann-Rauch R., Beck H., Fewou S.N., Gieselmann V. (2007). Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. J Neurosci 27:9009–9021.
- Eckhardt M. (2008). The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. Mol Neurobiol 37:93-103.
- Elleder M. (1989). Niemann-Pick disease. Path Res Pract 185:293-328.
- Ellinwood N.M., Vite C.H., Haskins M.E. (2004). Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models. J Gene Med 6:481–506.
- El-Tahir H.M., Abouzied M.M., Gallitzendoerfer R., Gieselmann V., Franken S. (2009). Hepatoma-derived growth factor-related protein-3 interacts with microtubules and promotes neurite outgrowth in mouse cortical neurons. J Biol Chem 284:11637-11651.
- Erne B., Sansano S., Frank M., Schaeren-Wiemers N. (2002). Rafts in adult peripheral nerve myelin contain major structural myelin proteins and myelin and lymphocate protein (MaL) and CD59 as specific markers. J Neurochem 82:550-562.

- Eto Y., Shen J.S., Meng X.L., Ohashi T. (2004). Treatment of lysosomal storage disorders: cell therapy and gene therapy. J Inherit Metab Dis 27:411–415.
- Faingold C., Gehlbach G., Travis M.A., Caspary D.M. (1986a). Inferior colliculus neuronal response abnormalities in genetically epilepsy-prone rats: evidence for a deficit of inhibition. Life Sci 39:869-878.
- Faingold C., Gehlbach G., Caspary D.M. (1986b). Decreased effectiveness of GABA-mediated inhibition in the inferior colliculus of the genetically epilepsy-prone rat. Exp Neurol 93:145-159.
- Faingold C., Gehlbach G., Caspary D.M. (1989). On the role of GABA as an inhibitory neurotransmitter in inferior colliculus neurons: iontophoretic studies. Brain Res 500:302-312.
- Faingold C., Walsh E.J., Maxwell J.K., Randall M.E. (1990). Audiogenic seizure severity and hearing deficits in the genetically epilepsy-prone rat. Exp Neurol 108:55-60.
- Faingold C., Boersma Anderson C.A., Caspary D.M. (1991a). Involvement of GABA in acoustically-evoked inhibition in inferior colliculus neurons. Hear Res 52:201-216.
- Faingold C., Gehlbach G., Caspary D.M. (1991b). Functional pharmacology of inferior colliculus neurons. In: Altschuler, R.A., Neurobiology of Hearing: The Central Auditory System. Raven Press, NY 223-251.
- Faingold C., Randall M.E., Anderson C.A. (1994). Blockade of GABA uptake with tiagabine inhibits audiogenic seizures and reduces neuronal firing in the inferior colliculus of the genetically epilepsy-prone rat. Exp Neurol 126:225-232.
- Faingold C. & Casebeer D. (1999). Modulation of the audiogenic seizure network by noradrenergic and glutamatergic receptors of the deep layers of superior colliculus. Brain Res 821:392-399.
- Faingold C., Li Y., Evans M.S., (2000). Decreased GABA and increased glutamate receptor-mediated activity on inferior colliculus neurons in vitro are associated with susceptibility to ethanol withdrawal seizures. Brain Res 868:287-295.
- Faingold C. (2002). Role of GABA abnormalities in the Inferior Colliculus pathophysiology - audiogenic seizures. Hear Res 168:223-237.
- Feliciano M. & Potashner S.J., (1995). Evidence for a glutamatergic pathway from the guinea pig auditory cortex to the inferior colliculus. J Neurochem 65:1348-1357.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissus. J Biol Chem 226:497-509.

- Fredman P., Mattsson L., Andersson K., Davidsson P., Ishizuka I., Jeansson S., Månsson J.E., Svennerholm L. (1988). Characterization of the binding epitope of a monoclonal antibody to sulphatide. Biochem J 251:17-22.
- Fukaya M., Kato A., Lovett C., Tonegawa S., Watanabe M. (2003). Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 100:4855– 4860.
- Garcia-Cairasco N. (2002). A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. Hear Res 168:208-222.
- Geeraert L., Mannaerts G.P., van Veldhoven P.P. (1997). Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. Biochem J 327:125-132
- Gerasimenko J.V., Gerasimenko O.V., Petersen O.H. (2001). Membrane repair: $Ca^{(2+)}$-elicited lysosomal exocytosis. Curr Biol 11:971-974.
- Gieselmann V. (1995). Lysosomal storage disease. Biochim Biophys Acta 1270:103-136.
- Gieselmann V., Matzner U., Hess B., Lüllmann-Rauch R., Coenen R., Hartmann D., D'Hooge R., DeDeyn P., Nagels G. (1998). Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model. J Inherit Metab Dis 21:564-574.
- Gieselmann V., Franken S., Klein D., Mansson J.E., Sandhoff R., Lüllmann Rauch R., Hartmann D., Saravanan V.P., De Deyn P.P., D'Hooge R., van der Linden A.M., Schaeren-Wiemers N. (2003). Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation. Acta Paediatr Suppl 92:74-79
- Gravel R.A., Clarke J.T.R., Kaback M.M., Mahuran D., Sandhoff K., Suzuki K. in Scriver C.R., Beaudet Al., Vall D., Sly W.S. (1995). The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw Hill, NY 2839- 2879.
- Griffiths I., Klugmann M., Anderson T., Yool D., Thomson C., Schwab M.H., Schneider A., Zimmermann F., McCulloch M., Nadon N., Nave K.A. (1998a). Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. Science 280:1610-1613.
- Griffiths I.R., Klugmann M., Anderson T.J., Thomson C., Vouyiouklis D., Nave K.A. (1998b). Current concepts of PLP and its role in the nervous system. Microsc Res Tech 41:344-358.
- Gustavson K.H. & Hagberg B. (1971). The incidence and genetics of metachromatic leucodystrophy in northern Sweden. Acta Paediatr Scand 60:585-590.

- Hammond C. & Helenius A. (1995). Quality control in the secretory pathway. Curr Opin Cell Biol 7:523–529.
- Han X, M Holtzman D, McKeel DW Jr, Kelley J, Morris JC. (2002). Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. J Neurochem 82:809-818.
- Han X, Cheng H, Fryer J.D., Fagan A.M., Holtzman D.M. (2003). Novel Role for Apolipoprotein E in the Central Nervous System. J Biol Chem 278:8043-8051.
- Han X. (2004). The role of apolipoprotein E in lipid metabolism in the central nervous system. Cell Mol Life Sci 61:1896-1906.
- Han X. (2007). Potential mechanisms contributing to sulfatide depletion at the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer’s disease: a tale of shotgun lipidomics. J Neurochem 103:171–179.
- Heim P., Claussen M., Hoffmann B., Conzelmann E., Gartner J., Harzer K., Hunneman D.H., Kohler W., Kurlemann G., Kohlschutter A. (1997). Leukodystrophy incidence in Germany. Am J Med Genet 71: 475-478.
- Helenius A., Marquardt T., Braakman I. (1992). The endoplasmic reticulum as a proteinfolding compartment. Trends Cell Biol 2:227–231.
- Henn FA, Hansson HA, Hamberger A. (1972). Preparation of plasma membrane from isolated neurons. J Cell Biol 53:654-661.
- Henry K.R. (1967). Audiogenic seizure susceptibility induced in C57BL-6J mice by prior auditory exposure. Science 158:938-940.
- Hess B., Saftig P., Hartmann D., Coenen R., Lüllmann-Rauch R., Goebel H.H., Evers M., von Figura K., D’Hooge R., Nagels G., De Deyn P., Peters C., Gieselmann V. (1996). Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice relationship to human metachromatic leukodystrophy. Proc Natl Acad Sci USA 93:14821-14826.
- Hirahara Y., Bansal R., Honke K., Ikenaka K., Wada Y. (2004). Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice. Glia 45:269–277.
- Hodges B.L. & Cheng S.H. (2006). Cell and gene-based therapies for the lysosomal storage diseases. Curr Gene Ther 6:227–241.
- Honke K., Zhang Y., Cheng X., Kotani N., Taniguchi N. (2004). Biological roles of sulfoglycolipids and pathophysiology of their deficiency. Glycoconj J 21:59-62.

- Horak M. & Wenthold R. J. (2009). Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. J Biol Chem 284:9683–9691.
- Hoshi T., Suzuki A., Hayashi S., Tohyama K., Hayashi A., Yamaguchi Y., Takeuchi K., Baba H. (2007). Nodal protrusions, increased Schmitdt- Lantermann incisures, and paranodal disorganisations are characteristic features of sulfatide-deficient peripheral nerves. Glia 55:584-594.
- Hucho F. (1982). Einführung in die Neurochemie, ein Lehrbuch. Verlag Chemie, Weinheim.
- Huwiler A., Kolter T., Pfeilschifter J., Sandhoff K. (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. Biochim Biophys Acta 1485:63-99.
- Isaac G., Pernber Z., Gieselmann V., Hansson E., Bergquist J., Månsson J.E. (2006). Sulfatide with short fatty acid dominates in astrocytes and neurons. FEBS J 273:1782–1790.
- Ishibashi T., Dupree J.L., Ikenaka K., Hirahara Y., Honke K., Peles E., Popko B., Suzuki K., Nishino H., Baba H. (2002). A myelin galactolipid, sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation. J Neurosci 22:6507–6514.
- Iwamori M. & Moser H. W. (1975). Above-Normal Urinary Excretion of Urinary Ceramides in Farber's Disease and Characterization of Their Component by High Performance Liquid Chromatography. Clin Chem 21:725-729.
- Jatzkewitz H. (1958). Two types of cerebroside sulfates as so-called prelipids and storage substances in leukodystrophy of type Scholz (metachromatic form of diffuse sclerosis). Hoppe Seylers Z Physiol Chem 311:279-282.
- Jatzkewitz H. & Sandhoff K. (1963). On a biochemically special form of a infantile amaturotic idiocy. Biochim Biophys Acta 70:354-356.
- Jatzkewitz H., Mehl E., Sandhoff K. (1970). Blocks in the catabolism of sulphatides and gangliosides as a cause of human neurological diseases. Biochem J 117:6-8.
- Jmoudiak M. & Futerman A.H. (2005). Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. Br J Haematol 129:178–188.
- Kai N. & Niki H. (2002). Altered tone-induced Fos expression in the mouse inferior colliculus after early exposure to intense noise. Neurosci Res 44:305-313.

- Karlsson K.A. (1981). Animal Glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. Annu Rev Biochem 58:309-350.
- Kawai H., Allende M.L., Wada R., Kono M., Sango K., Deng C., Miyakawa T., Crawley J.N., Werth N., Bierfreund U., Sandhoff K., Proia R.L. (2001). Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. J Biol Chem 276:6885-6888.
- Kishimoto Y., Hiraiwa M., O'Brien J.S. (1992). Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. J Lipid Res 33:1255–1267.
- Klein B.D., Fu Y.H., Ptacek L.J., White H.S. (2004). c-Fos immunohistochemical mapping of the audiogenic seizure network and tonotopic neuronal hyperexcitability in the inferior colliculus of the Frings mouse. Epilepsy Res 62:13-25.
- Kolter T., Proia R.L., Sandhoff K. (2002). Combinatorial ganglioside biosynthesis. J Biol Chem 277:25859-25862.
- Kolter T. & Sandhoff K. (1999). Sphingolipids: their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative diseases. Angew Chem Int Ed 38:1532-1568.
- Kolter T. & Sandhoff K. (2005). Principles of lysosomal membran digestion: stimulation of sphingolipid degradation by spingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. Annu Rev Cell Dev Biol 21:81-103.
- Kovács K.J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. J Neuroendocrinol 20:665-672.
- Kornfeld S. (1992). Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. Annu Rev Biochem 61:307-330.
- Krämer E.M., Schardt A., Nave K.A. (2001). Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. Microscop Res Tech 52:656-671.
- Krämer-Albers E-M., Bretz N., Tenzer S., Winterstein C., Möbius W., Berger H., Nave K-A., Schild H., Trotte J. (2007). Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? Proteomics Clin App 1:1446–1461.
- Kreutzberg G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19:312-318.
- Kreysing J., von Figura K., Gieselmann V. (1990). Structure of the arylsulfatase A gene. Eur J Biochem 191:627-631.
- Kreysing J., Polten A., Hess B., von Figura K., Menz K., Steiner F., Gieselmann V. (1994) Structure of the mouse arylsulfatase A gene and cDNA. Genomics 19:249-256.

- Kwon J. & Pierson M. (1997). Fos-immunoreactive responses in inferior colliculi of rats with experimental audiogenic seizure susceptibility. Epilepsy Res. 27:89-99.
- Kyse-Andersen J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatous without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Bioch Biophys Methods 10:203-209
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Learish R., Ohashi T., Robbins P.A., Bahnson A., Boggs S.S., Patrene K., Schwartz B.E., Gieselmann V., Barranger J.A. (1996). Retroviral gene transfer and sustained expression of human arylsulfatase A. Gene Ther 3:343-349.
- Letourneur F., Gaynor E.C., Hennecke S., D´emollière C., Duden R. (1994). Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. Cell 79:1199–1207.
- Li S., Liquari P., McKee K.K., Harrison D., Patel R., Lee S., Yurchenco P.D. (2005). Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. J Cell Biol 169:179–189.
- Li X., Serwanski D.R., Miralles C.P., Bahr B.A., De Blas A.L. (2007). Two pools of Triton X-100-insoluble GABA(A) receptors are present in the brain, one associated to lipid rafts and another one to the post-synaptic GABAergic complex. J Neurochem 102:1329-1345.
- Liao W.H., van Den A.T., Herman P., Frachet B., Huy P.T., Lecain E., Marianowski R. (2000). Expression of NMDA, AMPA and GABA (A) receptor subunit mRNAs in the rat auditory brainstem. II. Influence of intracochlear electrical stimulation. Hear Res 150:12-26.
- Lingwood D., Fisher L.J., Callahan J.W., Ballantyne J.S. (2004). Sulfatide and Na^+-K^+-ATPase: a salinity-sensitive relationship in the gill basolateral membrane of rainbow trout. J Membr Biol 201:77–84.
- Lingwood D., Harauz G., Ballantyne J.S. (2005). Regulation of fish gill $Na^{(+)}$-$K^{(+)}$-ATPase by selective sulfatide-enriched raft partitioning during seawater adaptation. J Biol Chem 280:36545–36550.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275.
- Lüllmann-Rauch R., Matzner U., Franken S., Hartmann D., Gieselmann V. (2001). Lysosomal sulfoglycolipid storage in the kidneys of mice deficient for arylsulfatase A

(ASA) and of double-knockout mice deficient for ASA and galactosylceramide synthase. Histochem Cell Biol 116:161-169.

- Maceyka M., Milstien S., Spiegel S. (2005). Sphingosine kinases, sphingosine-1-phosphate and sphingolipidomics. Prostaglandins Other Lipid Mediat 77:15-22.
- Marcus J., Honigbaum S., Shroff S., Honke K., Rosenbluth J., Dupree J.L. (2006). Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure. Glia 53:372–381.
- Markwell M.A.K., Svennerholm L., Paulson J.C. (1981). Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. Proc Natl Acad Sci USA 78:5406-5410.
- Martín–Belmonte F., Arvan P., Alonso M.A. (2001). MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. J Biol Chem 276:49337-49342.
- Martín–Belmonte F., Puertollano R., Millán J., Alonso M.A. (2000). The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and Fischer rat thyroid cell lines. Mol Biol Cell 11:2033-2045.
- Matzner U, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Coenen R, Rothert F, Månsson JE, Fredman P, D'Hooge R, De Deyn PP, Gieselmann V. (2002). Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: effects on visceral and nervous system disease manifestations. Gene Ther 9:53-63.
- Matzner U. & Gieselmann V. (2005). Gene therapy of metachromatic leukodystrophy. Expert Opin Biol Ther 5:55–65.
- McIlhinney R.A., Le Bourdellès B., Molnár E., Tricaud N., Streit P. & Whiting P.J. (1998). Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. Neuropharmacology 37:1355– 1367.
- Michel C., van Echten-Deckert G., Rother J. Sandhoff K., Wang E., Merill Jr. A.H. (1997). Characterization of Ceramide Synthesis. J Biol Chem 272:22432-22437.
- Miebach E. (2005). Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type I. Acta Paediatr Suppl 94:58–60.
- Miyatake T. & Suzuki K. (1972). Globoid cell leukodystrophy: additional deficienciy of psychosine galactosidase. Biochem Biophys Res Commun 48:538-543.

- Molander-Melin M., Pernber Z., Franken S., Gieselmann V., Månsson J.E., Fredman P. (2004). Accumulation of sulfatide in neuronal and glial cells of arylsulfatase A deficient mice. J Neurocytol 33:417–427.
- Morell P. & Radin N.S. (1969). Synthesis of cerebroside by brain from uridine diphosphate galactose and ceramide containing hydroxy fatty acid. Biochemistry 8:506-512.
- Morell P., Quarles R.H., Norton W.T. (1994). Myelin formation, structure, and biochemistry. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects 117-143.
- Morgan J.I., Cohen D.R., Hempstead J.L., Curran T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. Science 237:192–197.
- Morgan J.I. & Curran T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. Trends Neurosci 12: 459–462.
- Morgan J.I. & Curran T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. T Annu Rev Neurosci 14:421-451.
- Moyses C. (2003). Substrate reduction therapy: clinical evaluation in type 1 Gaucher disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358:955–960.
- Munro S. (1995). An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. EMBO J 14:4695-4704.
- Nehls S., Snapp E.L., Cole N.B., Zaal K.J.M., Kenworthy A.K. (2000). Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. Nat Cell Biol 2:288–295.
- Nilsson T., Lucocq J.M., Mackay D., Warren G. (1991). The membrane spanning domain of beta-1,4-galactosyltransferase specifies trans Golgi localization. EMBO J 10:3567-3575.
- Nilsson T., Slusarewicz P., Hoe M.H., Warren G. (1993). Kin recognition. A model for the retention of Golgi enzymes. FEBS Lett 330:1-4.
- Nilsson T., Hoe M.H., Slusarewicz P., Rabouille C., Watson R., Hunte F., Watzele G., Berger E.G., Warren G. (1994). Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. EMBO J 13:562-574.
- Norton W.T. & Poduslo S.E. (1982) Biochemical studies of metachromatic leukodystrophy in three siblings. Acta Neuropathol 57:188-196.
- Ogawa D., Shikata K., Honke K., Sato S., Matsuda M., Nagase R., Tone A., Okada S., Usui H., Wada J., Miyasaka M., Kawashima H., Suzuki Y., Suzuki T., Taniguchi N.,

Hirahara Y., Tadano-Aritomi K., Ishizuka I., Tedder T.F., Makino H. (2004). Cerebroside sulfotransferase deficiency ameliorates L-selectin-dependent monocyte infiltration in the kidney after ureteral obstruction. J Biol Chem 279:2085-2090.

- Okabe S., Miwa A., Okado H. (1999). Alternative Splicing of the C-Terminal Domain Regulates Cell Surface Expression of the NMDA Receptor NR1 Subunit. J Neurosci 19:7781–7792.
- Pan B.T., Teng K., Wu C., Adam M., Johnstone R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. J Cell Biol 101:942–948.
- Pastores G.M. & Thadhani R. (2002). Advances in the management of Anderson-Fabry disease: enzyme replacement therapy. Expert Opin Biol Ther 2:325–333.
- Patrick A.D. (1965). A deficiency of Glucocerebrosidase in Gaucher's Disease. Biochem J 97:17-18.
- Paul P., Kamisaka Y., Marks D.L., Pagano R.E. (1996). Purification and characterization of UDP-glucose: ceramide glucosyltransferase from rat liver Golgi membranes. J Biol Chem 271:2287-2293.
- Pernber Z., Molander-Melin M., Bethold C.H., Hansson E., Fredman P. (2002). Expression of the Myelin and oligodendrocyte progenitor marker sulfatide in neurons and astrocytes of adult rat brain. J Neurosci Res 69:86-93.
- Pernber Z., Richter K., Mansson J.E., Nygren H. (2007). Sulfatide with different fatty acids has unique distributions in cerebellum as imaged by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). Biochim Biophys Acta 1771:202-209.
- Pesheva P., Gloor S., Schachner M., Probstmeier R. (1997). Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism. J Neurosci 17:4642-4651.
- Pierson M. & Liebmann S.L. (1992). Noise exposure-induced audiogenic seizure susceptibility in Sprague-Dawley rats. Epilepsy Res 13:35-42.
- Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H., Foss D., Mahley R.W. (1987). Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. Biochim Biophys Acta 917:148-161.
- Platt F.M., Neises G.R., Dwek R.A., Butters T.D. (1994). N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. J Biol Chem 269:8362-8365.
- Plump A.S. & Breslow J.L. (1995). Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. Annu Rev Nutr 15:495-518.

- Pohlentz G., Klein D., Schwarzmann G., Schmitz D., Sandhoff K. (1988). Both GA2, GM2, and GD2 synthases and GM1b, GD1a, and GT1b synthases are single enzymes in Golgi vesicles from rat liver. Proc Natl Acad Sci USA 85:7044-7048.
- Posse de Chaves E.I. (2006). Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. Biochim Biophys Acta 1758:1995-2015.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J. and Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J Exp Med 108:945-956.
- Puertollano R. & Alonso M.A. (1999a). MAL, an integral element of the apical sorting machinery, is an itinerant protein that cycle between the trans-Golgi network and the plasma membrane. Mol Biol Cell 10:3435-3447.
- Puertollano R., Martín-Belmonte F., Millán J., de Marco M.C., Albar J.P., Kremer L., Alonso M.A. (1999b). The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. J Cell Biol 145:141–145.
- Qiu S., Zhang X.M., Cao J.Y., Yang W., Yan Y.G., Shan L., Zheng J., Luo J.H. (2009). An Endoplasmic Reticulum Retention Signal Located in the Extracellular Amino-terminal Domain of the NR2A Subunit of N-Methyl-D-aspartate Receptors. J Biol Chem 284:20285-20298.
- Raghavan S. & Kanfer J.N. (1972). Ceramide galactoside of enriched neuronal and glial fractions from rat brain. J Biol Chem 247:1055-6.
- Raivich G. & Banati R. (2004). Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. Brain Res Rev 46:261-281.
- Ramakrishnan H., Khalaj Hedayati K., Lüllmann-Rauch R., Wessig C., Fewou S.N., Maier H., Goebel H.H., Gieselmann V., Eckhardt M. (2007). Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. J Neurosci 27:9482–9490.
- Ramu Y., Xu Y., Lu Z. (2006). Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. Nature 442:696–699.
- Rasheed S., Nelson-Rees W.A., Toth E.M., Arnstein P., Gardner M.B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). Cancer 33:1027-1033.

- Reddy A., Caler E.V., Andrews N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by $Ca2^{+}$-regulated exocytosis of lysosomes. Cell 106:157–169.
- Rintoul D.A. & Welti R. (1989). Thermotropic behavior of mixtures of glycosphingolipids and phosphatidylcholine: effect of monovalent cations on sulfatide and galactosylceramide. Biochemistry 28: 26-31.
- Roberts D. D., Rao C. N., Magnani J. L., Spitalnik S. L., Liotta L. A., Ginsburg V. (1985). Laminin binds specifically to sulfated glycolipids. Proc Natl Acad Sci USA 82:1306-1310.
- Ross K.C., Coleman J.R., Jones L.S. (2001). Anti-epileptiform effects of audiogenic seizure priming on in vitro kindling in rat hippocampus. Neurosci Lett 299:234-238.
- Rother J., van Echten G., Schwarzmann G., Sandhoff K. (1992). Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. Biochem Biophys Res Commun 189:14-20.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- Sandhoff K. (1969). Variation of beta-N-acetylhexosaminidase-pattern in Tay- Sachs disease. FEBS Lett 4:351-354.
- Sandhoff K. (1977). The biochemistry of sphingolipid storage diseases. Angew Chem Int Ed Engl. 16:273-285.
- Sandhoff K., Conzelmann E., Neufeld E., Kaback M.M., Suzuki K. (1989). in: Scriver CR., Beaudet Al., Vall D., Sly WS. The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw Hill, New York, NY 1807-1839.
- Sandhoff K. & Kolter T. (1995). Glykolipide der Zelloberfläche – Biochemie ihres Abbaus. Naturwissenschaften 82:403-413.
- Sands M.S. & Davidson B.L. (2006). Gene therapy for lysosomal storage diseases. Mol Ther 13:839–849.
- Saravanan K., Schaeren-Wiemers N., Klein D., Sandhoff R., Schwarz A., Yaghootfam A., Gieselmann V., Franken S. (2004). Specific downregulation and mistargeting of the lipid raft-associated protein MAL in a glycolipid storage disorder. Neurobiol Dis 16:396-406.
- Saravanan K., Büssow H., Weiler N., Gieselmann V., Franken S. (2007). A spontaneously immortalized Schwann cell line to study the molecular aspects of metachromatic leukodystrophy. J Neurosci Methods 2007 161:223-233.

- Schaeren-Wiemers N., Bonnet A., Erb M., Erne B., Bartsch U., Kern F., Mantei N., Sherman D., Suter U. (2004). The raft-associated protein MAL ist required for maintenance of proper axon-glia interactions in the cetral nervous system. J Cell Biol 166:731-742.
- Schafer D.P., Bansal R., Hedstrom K.L., Pfeiffer S.E., Rasband M.N. (2004). Does paranode formation and maintenance require partitioning of neurofascin 155 into lipid rafts? J Neurosci 24:3176-3185.
- Schafer D.P. & Rasband MN. (2006). Glial regulation of the axonal membrane at nodes of Ranvier. Curr Opin Neurobiol 16:508-514.
- Schiffmann R. & Brady R.O. (2002). New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. Drugs 62:733–742.
- Schmidt B., Selmer T., Ingendoh A., von Figura K. (1995). A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. Cell 82:271-278.
- Schmidt R.F. & Thews G. (2000). Physiologie des Menschen. Berlin, Heidelberg, New York. Springer.
- Schneider A., Lander H., Schulz G., Wolburg H., Nave K.A., Schulz J.B., Simons M. (2005). Palmitoylation is a sorting determinant for transport to the myelin membrane. J Cell Sci 118:2415–2423.
- Schott I., Hartmann D., Gieselmann V., Lüllmann-Rauch R. (2001). Sulfatide storage in visceral organs of arylsulfatase A-deficient mice. Virchows Arch 439:90-96.
- Schreiber R.A. & Graham J.M. (1976). Audiogenic priming in DBA/2J and C57BL/6J mice: interactions among age, prime-to-test interval and index of seizure. Dev Psychobiol 9:57–66.
- Schulte S. & Stoffel W. (1993). Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. Proc Natl Acad Sci USA. 90:10265-10269.
- Schulze D., Rapedius M., Krauter T., Baukrowitz T. (2003). Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of KATP channels by the same mechanism. J Physiol 552:357 –367.
- Schwarz A., Terstappen G.C., Futerman, A.H. (1997). Isolation of gangliosides by cloud-point extraction with a nonionic detergent. Anal Biochem 254:221-225.

- Seko A., Hara-Kuge S., Yamashita K. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel human galactose 3-O-sulfotransferase that transfers sulfate to gal beta 1-3galNAc residue in O-glycans. J Biol Chem 276(28):25697-25704.
- Sevin C., Verot L., Bernaiss A., van Dam D., Bonnin D., Nagels G., Fouquet F., Gieselmann V., Vanier M.T., DeDeyn P.P., Alibourg P., and Carier N. (2007). Partial cure of established disease in an animal model of metachromatic leukodystrophy after intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer. Gene Ther 14:405-414.
- Shapiro L.J., Aleck K.A., Kaback M.M., Itabashi H., Desnick R.J., Brand N., Stevens R.L., Fluharty A.L., Kihara H. (1979). Metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase A deficiency. Pediatr Res 13:1179-1181.
- Siatskas C. & Medin J.A. (2001). Gene therapy for Fabry disease. J Inherit Metab Dis 2:25–41.
- Simons K. & Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 1:31-39.
- Simons K. & Vaz W.L. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. Annu Rev Biophys Biomol Struct 33:269-295.
- Singer S.J. & Nicolson G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175:720-731.
- Sprong H., Kruithof B., Leijendekker R., Slot J.W., van Meer G., van der Sluijs P. (1998). UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 273:25880-25888.
- Stahl N., Jurevics H., Morell P., Suzuki K., Popko B. (1994). Isolation, characterization, and expression of cDNA clones that encode rat UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase. J Neurosci Res 38:234-242.
- Standley S., Roche K.W., McCallum J., Sans N., Wenthold R.J. (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. Neuron 28:887–898.
- Stoffel W. & Bosio A. (1997). Myelin glycolipids and their functions. Curr Opin Neurobiol 7:654-661.
- Stoffyn P. & Stoffyn A. (1963). Structure of sulfatides. Biochim Biophys Acta 70:218-220.
- Stoffyn P.J. (1966). The structure and chemistry of sulfatides. J Am Oil Chem Soc 43:69-74.

- Storrie B., White J., Röttger S., Stelzer E.H.K., Suganuma T., Nilsson T. (1998). Recycling of Golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. J Cell Biol 143:1505–1521.
- Streit W.J. (2001). Microglia and macrophages in the developing CNS. Neurotoxicology 22:619-624.
- Stroobants S., Leroy T., Eckhardt M., Aerts J-M., Berckmans D., D'Hooge R. (2008). Early signs of neurolipidosis-related behavioural alterations in a murine model of metachromatic leukodystrophy. Behav Brain Res 189:306–316.
- Suneja S.K., Benson C.G., Gross J., Potashner S.J. (1995). Evidence for glutamatergic projections from the cochlear nucleus to the superior olive and the ventral nucleus of the lateral lemniscus. J Neurochem 64:161-171.
- Suzuki K. & Suzuki Y. (1970). Globoid cell Lekuodystrophy (Krabbe's Disease): Deficiency of Galactocerebroside-β-Galactosidase. Proc Natl Acad Sci USA 66:302-309.
- Suzuki K., Suzuki Y., Suzuki K. in: Scriver C.R., Beaudet A.L., Vall D., Sly W.S. (1995). The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw Hill, New York, NY 2671-2692.
- Svennerholm L., Boström K., Fredman P., Jungbjer B., Månsson J.E., Rynmark B.M. (1992). Membrane lipids of human peripheral nerve and spinal cord. Biochim Biophys Acta 1128:1-7.
- Taha T.A., Mullen T.D., Obeid L.M. (2006). A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. Biochim Biophys Acta 1758:2027-2036.
- Taylor C.M., Marta C.B., Bansal R., Pfeiffer S.E. (2004). The transport, assembly, and function of myelin lipids. In: Lazzarini RA. Myelin biology and disorders. 1. Academic, NY 57–88.
- Thudichum J.L.W. (1884). A treatise on the chemical constitution of the brain, London.
- Tilman T.S. & Cascio M. (2003). Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. Cell Biochem Biophys 38:161-190.
- Vacher M., Waks M., Nicot C. (1989). Myelin proteins in reverse micelles: tight lipid association required for insertion of the Folch-Pi proteolipid into a membrane-mimetic system. J Neurochem 52:117-123.

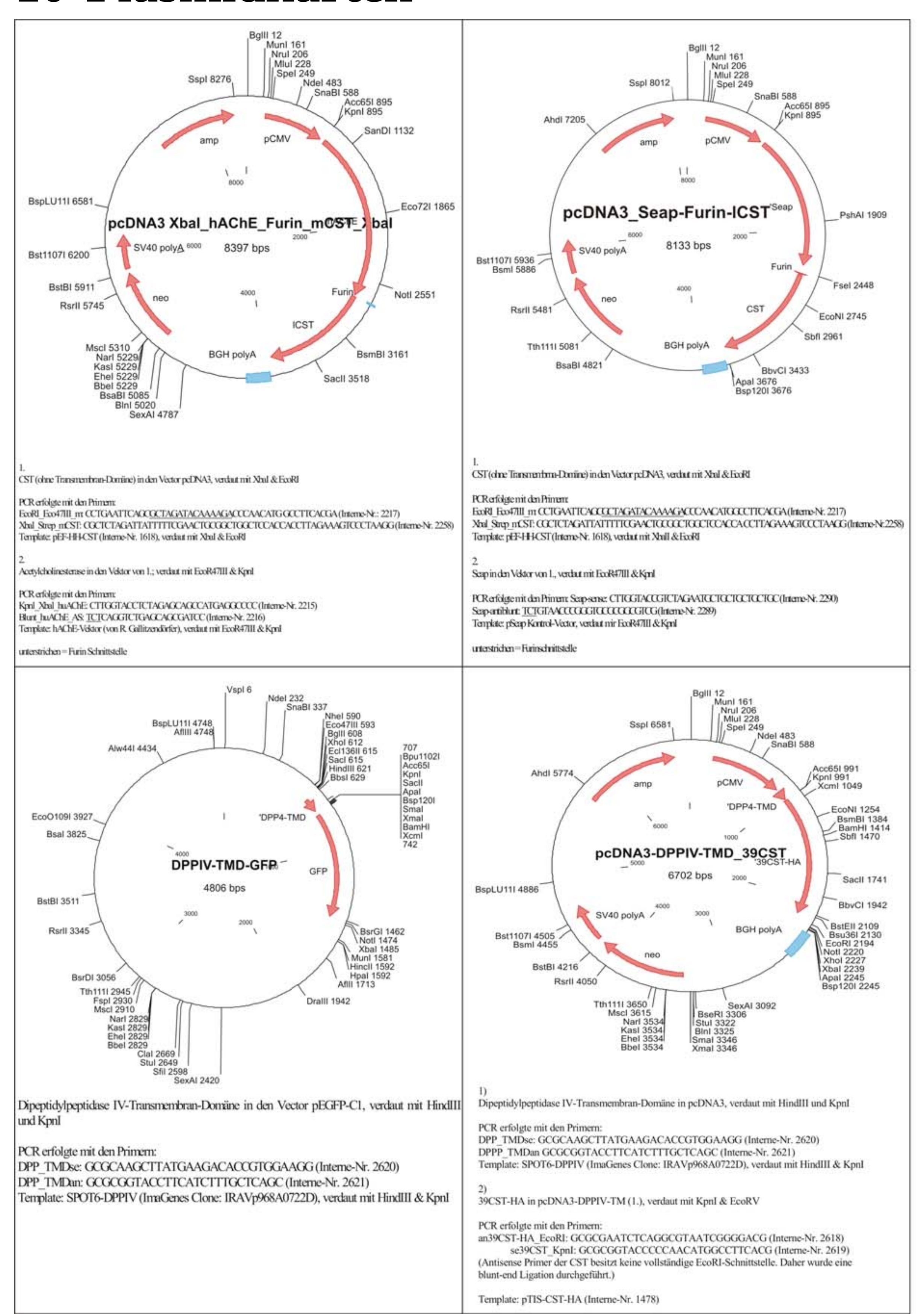
- van der Bijl P., Lopes-Cardozo M., van Meer G. (1996). Sorting of newly synthesized galactosphingolipids to the two surface domains of epithelial cells. J Cell Biol. 132:813-821.
- van Echten-Deckert G. (2000). Sphingolipid extraction and analysis by thin-layer chromatography. Methods Enzymol 64-79.
- van Echten-Deckert G. & Herget T. (2006). Sphingolipid metabolism in neural cells. Biochim Biophys Acta 1758:1978-1994.
- van Meer G. & Lisman Q. (2002). Sphingolipid transport: rafts and translocators. J Biol Chem 277:25855-25858.
- Vance J.E., Karten B., Hayashi H. (2006). Lipid dynamics in neurons. Biochem Soc Trans 34:399-403.
- Vellodi A., Foo Y., Cole T.J. (2005). Evaluation of three biochemical markers in the monitoring of Gaucher disease. J Inherit Metab Dis 28:585-592.
- von Figura K., Gieselmann V., Jaeken J. (2001). Metachromatic Leukodystrophy. In: Scriver C.R., Beaudet AL., Vall D., Sly W.S. The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw Hill, NY 148:3695-3724.
- Vos J.P., Lopes-Cardozo M., Gadella B.M. (1994). Metabolic and functional aspect of sulfogalactolipids. Biochim Biophys Acta 1211:125–149.
- Walton K.M., Sandberg K., Rogers T.B., Schnaar R.L. (1988). Complex ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12 pheochromocytoma cells. J Biol Chem 263:2055-2063.
- Wang P.J., Hwu W.L., Shen Y.Z. (2001). Epileptic seizures and electroencephalographic evolution in genetic leukodystrophies. J Clin Neurophysiol 18:25–32.
- Wertz P. W. & van den Bergh, B. (1998). The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. Chem Phys Lipids 91:85-96.
- Willott J.F. & Turner J.G. (2000). Neural plasticity in the mouse inferior colliculus: relationship to hearing loss, augmented acoustic stimulation, and prepulse inhibition. Hear Res 147:275-281
- Wittke D., Hartmann D., Gieselmann V., Lüllmann-Rauch R. (2004). Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution. Acta Neuropathol 108:261-271.

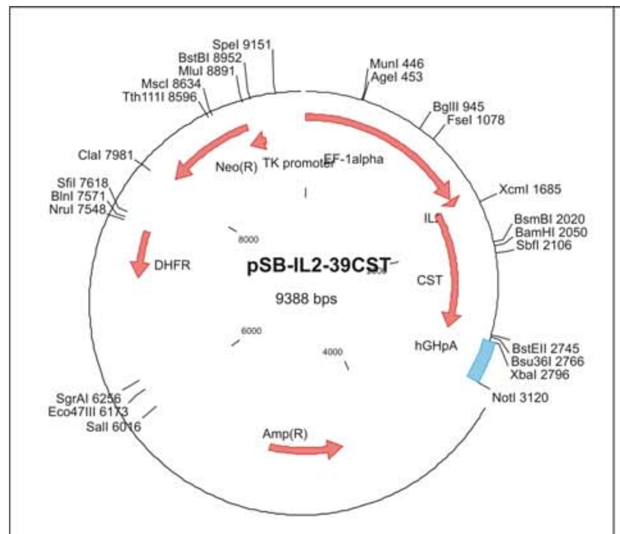
- Yaghootfam A., Gieselmann V., Eckhardt M. (2005). Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice. Eur J Neurosci 21:711-720.
- Yaghootfam A., Sorkalla T., Häberlein H., Gieselmann V., Kappler J., Eckhardt M. (2007). Cerebroside sulfotransferase forms homodimers in living cells. Biochemistry 46:9260-9269.
- Yamashita T., Wada R., Proia R.L. (2002). Early developmental expression of the gene encoding glucosylceramide synthase, the enzyme controlling the first committed step of glycosphingolipid synthesis. Biochim Biophys Acta 1573:236-240.
- Yamashita T., Wu Y.P., Sandhoff R., Werth N., Mizukami H., Ellis J.M., Dupree J.L., Geyer R., Sandhoff K., Proia R.L. (2005). Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glial interactions. Proc Natl Acad Sci USA. 102:2725-2730.
- Zaal K.J.M., Smith C.L., Polishchuk R.S., Altan N., Cole N.B. (1999). Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis. Cell 99:589–601.
- Zhang H. & Kelly J.B. (2001). AMPA and NMDA receptors regulate responses of neurons in the rat’s inferior colliculus. J Neurophysiol 86:871-880.

8 Abbildungsverzeichnis

9 Tabellenverzeichnis

10 Plasmidkarten





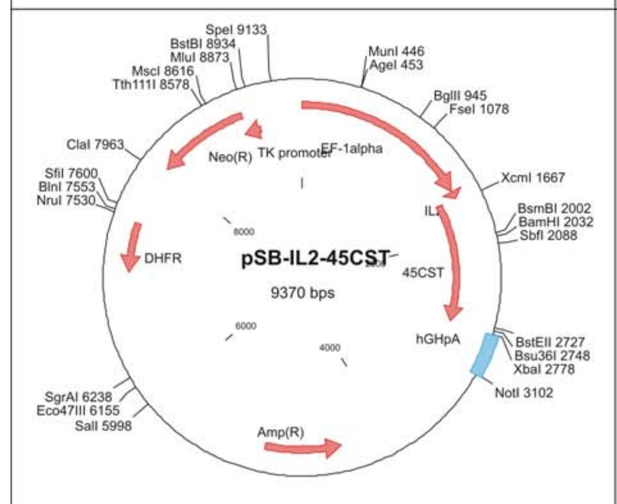
39CST innerhalb des Vectors pEF-HH-CST (lösliche CST wird vom amino-Terminus verkürzt; ohne His und HA-Tag) erstellt

PCR erfogte mit den Primern:
39 CST: CCCAACATGGCCTTCACGACC (Interne-Nr. 1734) Phosphoryliert!
anti-IL2-NEU: AGGTGCACTGTTTGTGACAAGTGCAAGACTTAGTGC (Interne-Nr. 1740)
Template: pSB-EF-CST

SpeI 9142
BstBI 8943
MluI 8882
MscI 8625
Tth111I 8587
MunI 446
AgeI 453
BglII 945
FseI 1078
ClaI 7972
Neo(R)
TK promoter
EF-1alpha
SfiI 7609
BlnI 7562
NruI 7539
XcmI 1676
IL2
BsmBI 2011
BamHI 2041
SbfI 2097
8000
DHFR
pSB-IL2-42CST
9379 bps
42CST
6000
4000
hGHpA
BstEII 2736
Bsu36I 2757
XbaI 2787
SgrAI 6247
Eco47III 6164
SalI 6007
NotI 3111
Amp(R)

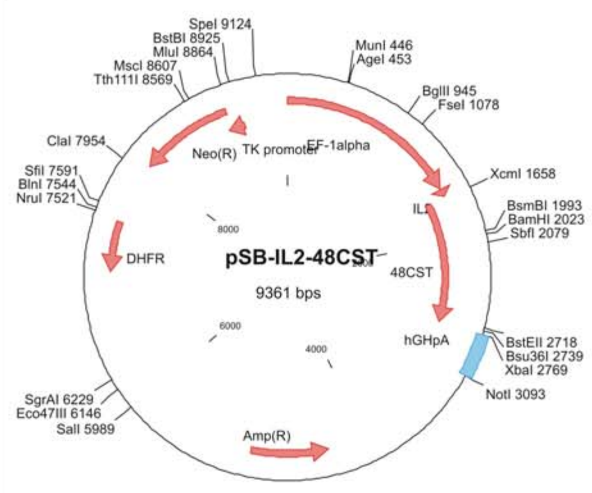
42CST innerhalb des Vectors pEF-HH-CST (lösliche CST wird vom amino-Terminus verkürzt, ohne His und HA-Tag) erstellt

PCR erfolgte mit den Primern:
42 CST: GCCTTCACGACCTCAGAGGC (Interne-Nr. 1735) Phosphoryliert!
anti-IL2-NEU: AGGTGCACTGTTTGTGACAAGTGCAAGACTTAGTGC (Interne-Nr. 1740)
Template: pSB-EF-CST



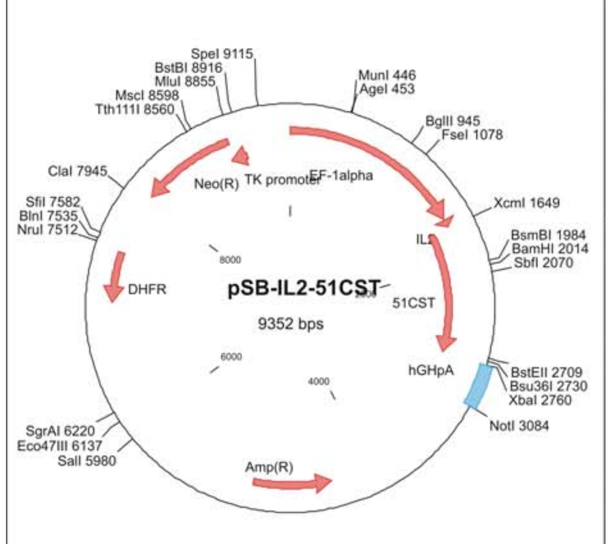
45CST innerhalb des Vectors pEF-HH-CST (lösliche CST wird vom amino-Terminus verkürzt, ohne His und HA-Tag) erstellt

PCR erfolgte mit den Primern:
45 CST: ACCTCAGAGGCTGCAGCACC (Interne-Nr. 1736) Phosphoryliert!
anti-IL2-NEU: AGGTGCACTGTTTGTGACAAGTGCAAGACTTAGTGC (Interne-Nr. 1740)
Template: pSB-EF-CST



48CST innerhalb des Vectors pEF-HH-CST (lösliche CST wird vom amino-Terminus verkürzt, ohne His und HA-Tag) erstellt

PCR erfolgte mit den Primern:
48 CST: GCTGCAGCACCCTGCTCC (Interne-Nr. 1737) Phosphoryliert!
anti-IL2-NEU: AGGTGCACTGTTTGTGACAAGTGCAAGACTTAGTGC (Interne-Nr. 1740)
Template: pSB-EF-CST



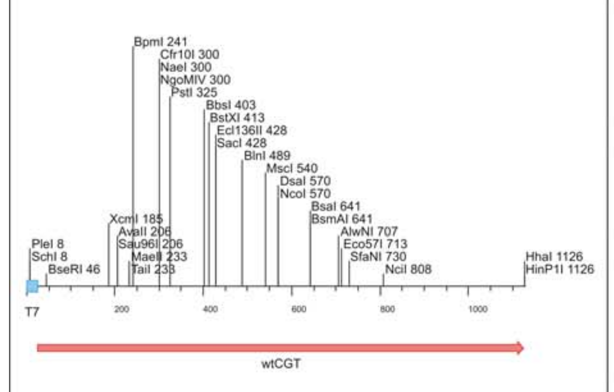
51CST innerhalb des Vectors pEF-HH-CST (lösliche CST wird vom amino-Terminus verkürzt, ohne His und HA-Tag) hergestellt

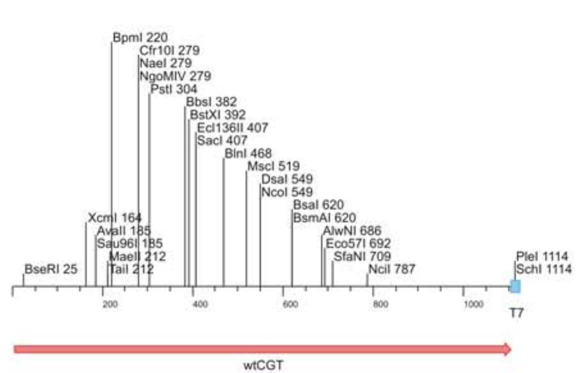
PCR erfolgte mit den Primern:
51 CST: CCCTGCTCCCCTATTCCCAATG (Interne-Nr. 1738) Phosphoryliert!
anti-IL2-NEU: AGGTGCACTGTTTGTGACAAGTGCAAGACTTAGTGC (Interne-Nr. 1740)
Template: pSB-EF-CST

HpaI 9624
AccIII 9307
FseI 133
BamHI 1105
SbfI 1161
SnaBI 8545
NdeI 8440
intron A
EF-1alpha
IL2
SpeI 8206
BstBI 8007
MluI 7946
CMV
39CST
BstEII 1800
Bsu36I 1821
XbaI 1851
MscI 7689
Tth111I 7651
TK promoter
hGHpA
NotI 2175
Neo(R)
pSB4.7-39CST
9755 bps
ClaI 7036
DHFR
SfiI 6673
BlnI 6626
NruI 6603
Amp(R)
SgrAI 5311
Eco47III 5228
SalI 5071

39CST in den Vektor pSB4.7 umkloniert
1.
IL2-39CST rausgeschnitten mit NotI und Bgl II
Template: pEF-IL2-39CST

2.
pSB4.7 verdaut mit NotI und BamHI und anschließend die 39CST in den geschnitten Vektor ligiert
Template: pSB4.7



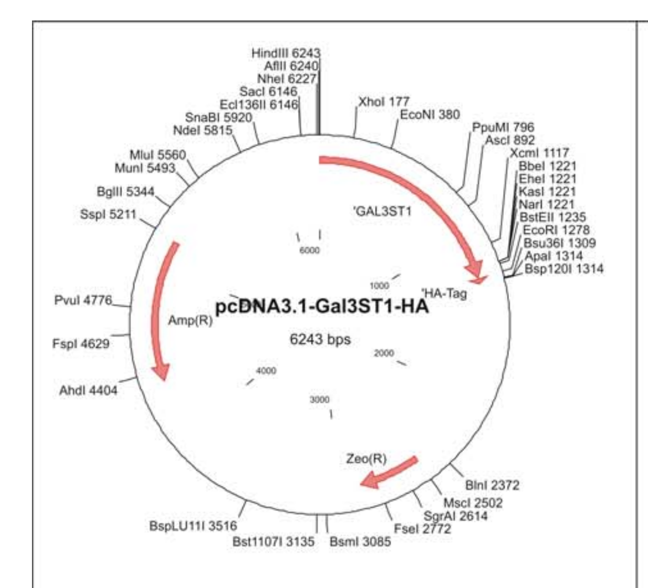


RNA CGTse Sonde

PCR erfolgte mit den Primern:
T7se_CGTse: GTAATACGACTCACTATAGGGGCTTATGTCCCAGAGTTTAAC (Interne-Nr. 2540)
T7se_CGTanti: GCGCTCATCTCACCTTCTTTTCG (Interne-Nr. 2541)
Template: pSB4.7-wtCGT
Die Herstellung der Sonde erfolgte mit Hilfe des RNA-Dig-Labbeling Kit (fermentas)

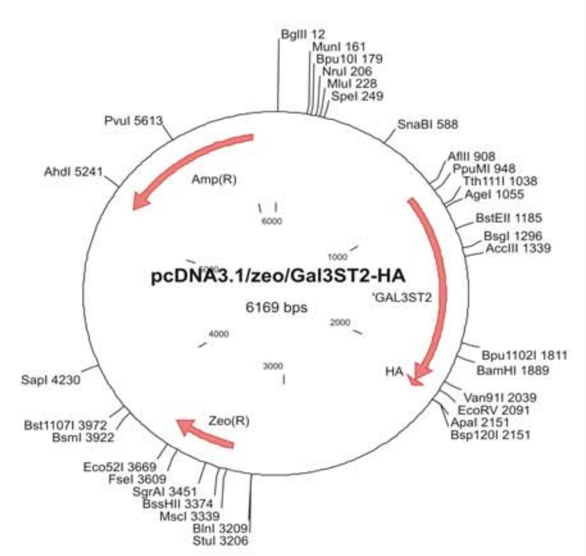
RNA-CGTanti Sonde

PCR erfolgte mit den Primern:
CGT1455: GCTTATGTCCCAGAGTTTAACTCAC (Interne-Nr. 2193)
T7an_CGTan: GTAATACGACTCACTATAGGGTCATCTCACCTTCTTTTCG (Interne-Nr. 2542)
Template: pSB4.7-wtCGT
Die Herstellung der Sonde erfolgte mit Hilfe des RNA-Dig-Labbeling Kit (fermentas)



Galaktose-3-O-Sulfotransferase 1(Gal3ST1) in den Vector pDNA3.1/zeo/FA2H-HA, FA2H wurde mit HindIII & EcoRI herausgeschnitten

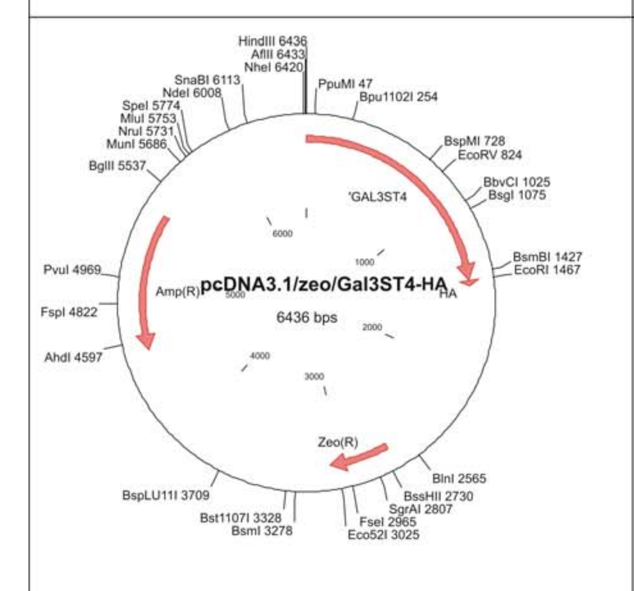
PCR von Gal3ST1 erfolgte mit den Primern:
GAL3ST1 se: GCAAGCTTACCATGCTGCCACCGCAGAAGAAGC (Interne-Nr. 2690)
GAL3ST1 an: GCGC**GAATTC**CCACCGCAGGAAATCGCG (Interne-Nr. 2691)
Template: ImaGenes IRAUp969B0566D



galβ-3GalNAc -3-O-Sulfotransferase 2 (Gal3ST2) in den Vector pcDNA3.1, verdaut mit HindIII & EcoRI

PCR von Gal3ST2 erfolgte mit den Primern:
GAL3ST2se: GCAAGCTTACCATGTCCATCCTGAGAGG (Interne-Nr. 2696)
GAL3ST2anti+C: CCTTTTTCAGGAATGGGATATCCTTGGGAGTC (Interne-Nr. 2698)
Template:GAL3ST2 aus muriner cDNA gewonnen

Vector und Template wurden nach dem Verdau mit Klenow aufgefüllt und im Anschluss daran erfolgte eine blunt-end Ligation



galβ-3GalNAc 3'-O-Sulfotransferase 4 (Gal3ST4) in den Vector pDNA3.1/zeo/FA2H-HA, FA2H wurde mit HindIII & EcoRI herausgeschnitten

PCR erfolgte mit den Primern:
GAL3ST4 se: GCGCAAGCTTACCATGGGCCCTCTCTCTCCTGCC (Interne-Nr. 2692)
GAL3ST4 an: GCGCGAATTCTGGGGAGAGTGGCCTTGAAGTCTTGAG (Interne-Nr. 2693)
Template: ImaGenes IRAUp969A1057D

11 Abkürzungsverzeichnis

Anm	Absorption bei einer Wellenlänge
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASA	Arylsulfatase A
ATP	Adenosin-5‘- Triphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CGT	Ceramid-Galaktosyltransferase
CST	Cerebrosid-Sulfotransferase
CHCl3	Chloroform
CHO	Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH2O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
DNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray Ionisation Massenspektroskopie
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GalCer	Galaktosylceramid
GalT	Galaktosyltransferase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GlcCer	Glukosylceramid
h	Stunde
HET	heterozygot
HRP	Meerrettichperoxidase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Knockout
Konz.	Konzentration
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar; Masse

mA	Milli-Ampère
MAG (S/L)	Myelin assoziiertes Glykoprotein (kurz/lang)
MALDI	Matrixassoziierte Laser Desorption / Ionisation
MBP	Myelin basisches Protein
MeOH	Methanol
min	Minute
MLD	metachromatische Leukodystrophie
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht; Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
n.d.	nicht detektierbar
NF	Neurofascin
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodezylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelswerts
SM	Sphingomyelin
ST	Standardabweichung
Sulf	Sulfatid
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
W	Watt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Institut durchführen zu können und für die Übernahme des Korreferats.

Einen besonderen Dank richte ich an Dr. M. Eckhardt für seine engagierte und ausgezeichnete Betreuung.
Danken möchte ich auch der Gieselmann-Gruppe für den regen Gedankenaustausch und die Unterstützung, die sie mir während meiner Arbeit entgegen gebracht haben. Besonders Danken möchte ich Annika, Christina, Frank, Ivonne, Lena, Lihua, Marion, Norbert und Silvia.

Herrn Prof. Dr. G. Schwarz danke ich für die Betreuung durch die mathematisch-naturwisschenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.

Herrn Prof. Dr. J. Howard danke ich für die Bereitschaft den Vorsitz der Prüfungskommission zu bekleiden.

Bei meinen Freunden, vor allem Kirstin und Marcel bedanke ich mich für ihre Aufmunterungen, Unterstützung und Verständnis.
Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meiner Familie und meinem Ehemann bedanken für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Geduld während der Promotion.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. G. Schwarz betreut worden.

Köln, den

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Rebekka van Zyl, V. Gieselmann; E.Eckhardt: "Elevated sulfatide levels in neurons causes lethal audiogenic seizures in mice"; submitted to Journal of Neurochemistry July 2009

Lebenslauf

Curriculum Vitae

Dipl. Biolog. Rebekka Maria van Zyl

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Rebekka Maria van Zyl (geb. Berger)

Adresse: Mühlenstr. 76, 50321 Brühl

Telefon: 02232-90145

Familienstand : verheiratet

Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

1989-1999 Gymnasium Erftstadt-Lechenich (Abitur)

1999-2005 Universität zu Köln

2005 Diplom in Biologie
Fächer: Genetik, Biochemie und Pharmakologie

2004-2005 Diplomarbeit im Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universität Köln (AG O. Krut)

- Thema: „Charakterisierung des phagosomalen Escape von zytotoxischen *S.aureus* Stämmen“

2005-2009 Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn
(AG Gieselmann, unter der Leitung von P.D. Dr. M. Eckhardt)

- Thema: „Untersuchung zur Speicherung und Funktion von Sulfatid in Neuronen anhand von transgenen Mäusen“